

# CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DES SOURCES ET DE LA DYNAMIQUE DE QUELQUES POLLUANTS PRIORITAIRES ORGANIQUES DANS L'ECOSYSTEME SOL

THESE No 681 (1987)

PRESENTÉE AU DEPARTEMENT DE GENIE RURAL ET GEOMETRE

ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE DE LAUSANNE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

PAR

PHILIPPE DIERCXSENS

Licencié en sciences chimiques, Université de Namur, Belgique  
de nationalité belge

acceptée sur proposition du jury :

Prof. J. Tarradellas, rapporteur

Prof. P. Péringier, corapporteur

Prof. J. Albaigés, corapporteur

Dr W. Giger, corapporteur

Lausanne, EPFL

1987

1

## REMERCIEMENTS

De nombreuses personnes ont , à divers titres, contribué à l'élaboration et la réalisation de cette recherche. Qu'elles soient ici sincèrement remerciées :

M. le professeur Joseph TARRADELLAS, directeur du groupe de recherche en écotoxicologie de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), qui, au cours des 5 années passées dans son laboratoire, a su, par son dynamisme, me transmettre son enthousiasme de la recherche et m'a permis d'effectuer mon travail dans des conditions que tout doctorant souhaiterait rencontrer. De plus son ouverture d'esprit et sa logique scientifique furent indispensables à mon cheminement intellectuel.

M. le professeur Jean-Claude VEDY, chef du département de Génie Rural et Géomètres, qui a accepté la présidence du jury de thèse. De plus il m'a ouvert en toute confiance les portes de son laboratoire et n'a pas hésité à me fournir une assistance scientifique et technique sans laquelle la réalisation du chapitre sur les tests respirométriques n'aurait été possible.

Dr. Joan ALBAIGES, directeur de l'Institut de Chimie Bio-organique de Barcelone (Espagne), qui a accepté de faire partie du jury. Sa rigueur scientifique, mais toujours amicale, me fut d'excellent conseil dans la rédaction de ce travail. A deux reprises il m'a mis son personnel et son appareillage scientifique à ma disposition pour pouvoir traiter certains échantillons.

Dr. Walter GIGER, directeur du groupe de recherche de chimie analytique organique à l'E.A.W.A.G (Dübendorf), qui a accepté de faire partie du jury. Ses conseils avisés et le contact fructueux avec son équipe de chercheurs durant le programme national de recherche 7D m'ont été d'un précieux secours lors de mes recherches.

M. le professeur Paul PERINGER, directeur du laboratoire de Génie Biologique de l'EPFL, qui m'a honoré de sa présence en tant que membre du jury et a mis à ma disposition le personnel de son équipe scientifique pour la résolution de certains problèmes techniques.

M. le professeur Lucien-Yves MAYSTRE, directeur de l'Institut du Génie de l'Environnement (IGE), qui m'a accepté comme doctorant au sein de son institut et à divers stades de la recherche m'a prodigué son aide et ses encouragements.

M. Felipe DE ALENCASTRO, chercheur au laboratoire d'écotoxicologie, dont les nombreux conseils amicaux m'ont permis d'améliorer certaines techniques analytiques.

Dr. Gérard CUENDET, chercheur au laboratoire d'écotoxicologie, qui m'a consacré une partie de son temps pour me conseiller dans la rédaction du chapitre sur les lombriciens et dont les talents artistiques et scientifiques m'ont permis de disposer d'un très beau dessin introductif à ce chapitre.

Mrs. Jules DE HEER, Pierre HONSBERGER, Christian JUNKER et Dominique ROSSEL, tous collaborateurs de l'IGE, qui à divers titres ont contribué à la correction de certaines parties de ce travail.

Mme. Myriam CHARLET, secrétaire de l'IGE, pour les nombreuses fois qu'elle m'a dactylographié des rapports.

Mme. Viviane MARTIN-PRELAZ et Melle. Alexandra GOLAY pour leur aide constante aux travaux, souvent ingrats, de laboratoire.

Dr. Raoul DANIEL, Dr. Heinz HAENI et Mr. Marc WEGMANN de la Station Fédérale de Recherche en Chimie Agricole et sur l'Hygiène de l'Environnement de Liebefeld, dont la collaboration fructueuse durant le programme national de recherche 7D a été indispensable pour la rédaction du 3ème chapitre de ce travail.

Mr. Jean-Daniel BONJOUR, assistant chercheur au laboratoire de photogrammétrie de l'EPFL, dont la disponibilité et les compétences informatiques ont été indispensables pour la réalisation des champs de fluorescence totale.

Le personnel scientifique du laboratoire de Pédologie et de Génie Biologique, en particulier Mrs. Jean-Pascal DUBOIS, Jean-David TEUSCHER, Melle Catherine STREHLER; Pierre AMMANN, Dr. Jean-Paul SCHWITZGUEBEL et François KISLIG, pour leur amitié, leur collaboration et leur disponibilité permanente.

Le personnel de la bibliothèque de l'EPFL, pour le nombre incalculable de publications qu'il m'a trouvé ... jusqu'en Chine.

Mr François BECK du service audiovisuel de l'EPFL, qui a réalisé toutes les diapositives de l'exposé.

Mrs. Manfred STEINER et Philippe CLEMENT, agriculteurs à Montherod (VD) et Ependes (Fr) respectivement, pour avoir mis leurs terrains à la disposition de cette recherche et pour les nombreuses discussions intéressantes sur les problèmes agricoles.

Je tiens à remercier du fond du coeur mes parents pour leur intérêt pour mon travail, leurs précieux encouragements et leur aide spontanée pour la correction des fautes d'orthographe et de syntaxe du manuscrit.

A ma femme, Nathalie, pour la mise au propre des figures, la correction du manuscrit et pour sa grande patience, j'exprime mes remerciements affectueux.

Que tous ceux, trop nombreux pour être cités nommément, qui m'ont aidé de près ou de loin, trouvent ici l'expression de ma gratitude.

---



A JULIE



La grandeur d'un métier est, peut-être, avant tout, d'unir les hommes : il n'est qu'un luxe véritable, et c'est celui des relations humaines.

En travaillant pour les seuls biens matériels, nous bâtissons nous-même notre prison.

Nous nous enfermons solitaires, avec notre monnaie de cendre qui ne procure rien qui vaille de vivre.

Antoine de Saint-Exupéry

Terre des hommes



## RESUME

Le but de ce travail est d'étudier les sources et la dynamique de quelques polluants prioritaires organiques dans l'écosystème sol.

Les principaux polluants organiques étudiés sont les hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH) et les polychlorobiphényles (PCB).

Les PAH contiennent des substances cancérigènes et ont une origine aussi bien anthropogénique que naturelle. Ils proviennent, entre autres, de la combustion incomplète de carburants fossiles ou de substances organiques de tout type.

Les PCB sont des inducteurs enzymatiques puissants et ont des effets immuno-modulateurs. Ils sont d'origine purement anthropogénique et sont utilisés principalement comme fluide diélectrique dans les transformateurs.

Le premier chapitre du travail revoit les mécanismes de production, les sources, la toxicité des PAH et des PCB ainsi que leurs voies de disparition dans l'écosystème sol.

Le second chapitre est basé sur l'élaboration d'une procédure permettant une représentation en 3 dimensions de la fluorescence totale d'échantillons contenant des PAH. Elle est obtenue au moyen d'un programme initialement créé pour des utilisations en géodésie et en photogrammétrie.

Le troisième chapitre étudie les voies de pénétration de quelques micropolluants organiques dans les sols agricoles. Il met en évidence l'importance des précipitations atmosphériques dans la contamination des écosystèmes terrestres par les PAH et les PCB. L'influence de l'épandage de boues d'épuration, de lisiers animaux et d'engrais minéraux sur la contamination des sols en PAH et en PCB est étudiée.

Le quatrième chapitre marque le début de l'étude de l'impact que peuvent avoir les PAH sur certains constituants de la biocénose. Il montre au moyen de 2 tests respirométriques que la nature du sol joue un rôle déterminant dans l'impact des PAH sur la respiration des micro-organismes.

Le cinquième chapitre est consacré à l'étude du transfert des hydrocarbures polycycliques aromatiques des sols vers les tissus des lombriciens. Il montre que des modifications de proportions de familles de substituants organiques s'y opèrent par rapport à celles du sol dans lequel les lombriciens vivent.

Le dernier chapitre fait la synthèse et énonce les conclusions générales de ce travail. Du point de vue analytique il met l'accent sur l'importance que revêt en écotoxicologie l'étude simultanée de plusieurs polluants ou l'utilisation de plusieurs techniques analytiques afin de pouvoir effectuer des recoupements d'observations. Du point de vue de l'écosystème sol il souligne l'importance de sa complexité comme facteur principal influençant les rapports entre les micropolluants organiques du sol et ceux contenu dans la biocénose.

---

## ABSTRACT

The aim of the present work is to study the sources and the dynamics of several organic priority pollutants in the soil's ecosystem.

The principal organic pollutants studied are the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and the polychlorinated biphenyls (PCB).

The PAHs contain carcinogenic substances and have a natural as well as an anthropogenic origin. They are produced, among others, by incomplete burning of fossil fuels or all other types of organic substances.

PCBs are strong enzymatic inducing agents. They have a purely anthropogenic origin and are used mainly as dielectric fluids in electric transformers.

The first chapter of this work gives some information about the production mechanisms, the sources and the toxicity of PAHs and PCBs. Their degradation pathways in the soil ecosystem are also discussed.

The second chapter is based on the realisation of total, 3 dimensional fluorescence figures of samples which contain PAHs. The program which is used was initially created for geodetic and photogrammetric purposes.

The third chapter studies the inputs of organic micropollutants in agricultural soils. One of the most important PAH and PCB sources in soil ecosystems are atmospheric precipitations. The influence of sewage sludge spreading and the use of animal manure and mineral fertilisers in the contamination of soils by PAHs and PCBs are also investigated.

The fourth chapter deals with the impact of PAHs on soil micro-organisms. Two respirometric tests are used to show the determinant effect which the soil structure plays in relation to the availability of PAHs on the activity of micro-organisms.

The fifth chapter deals with the transfer of PAHs from the soil to earthworm tissues. By means of mass-spectrometry, modifications of the proportions of pollutants are shown in the earthworm tissues as opposed to that of the soil in which they live.

The last chapter underlines the most important results of this work and draws the conclusions.

---

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit ist die Quellen und die Dynamik einiger organischen Schadstoffen in dem Bodenökosystem zu studieren.

Die wichtigsten Schadstoffen die studiert wurden, sind die polyaromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) und die Polychlorbiphenyle (PCB).

Die PAH sind ebenso natürlichen Ursprungs wie durch menschliche Tätigkeit bedingt. Sie enthalten krebserzeugende Substanzen.

Sie kommen unter anderem von unvollständiger Verbrennung von Treibstoff oder anderen organischen Substanzen.

Die PCB sind kräftige enzymatische Induktoren und verursachen immunbiologische Störungen. Sie sind ausschliesslich synthetisch hergestellt.

Das erste Kapitel dieser Arbeit behandelt die Produktionsmechanismen, die Quellen und die Giftigkeit der PAHs und PCBs und beschreibt ihren Verschwindenmechanismen im Bodenökosystem.

Das zweite Kapitel stellt ein Computerprogramm vor, das imstande ist, eine dreidimensionale Darstellung der Fluoreszenz von Bodenproben zu geben. Das Programm wurde anfänglich zu geodetischen und photogrammetrischen Zwecken geschaffen.

Das dritte Kapitel handelt über das Eindringen mehrerer organischer Schadstofffamilien in den Boden. Die Wirkung der Klärschlamm-, Schweinegülle- und Mineraldüngerausbreitung auf die Kontamination des Bodens mit PAH und PCB wurde untersucht. Die Forschungsergebnisse zeigen, dass hauptsächlich die atmosphärischen Einträge die Bodengehalte an PAH und PCB beeinflussen.

Das vierte Kapitel studiert die Wirkung von PAHs auf Bodenmicroorganismen. Es zeigt mit Hilfe von zwei atemmetrischen Testen, dass die Bodenstruktur eine bestimmende Bedeutung hat im Einschlag der PAHs auf die Bodenmicroorganismen.

Das fünfte Kapitel behandelt die Übertragung von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen vom Boden auf die Regenwürmer. Es zeigt dass Änderungen in den Proportionen organischer Schadstofffamilien stattfinden.

Das letzte Kapitel stellt die Synthese dar und drückt die Schlussfolgerungen dieser Arbeit aus.

---





# Table des matières

	PAGE
INTRODUCTION GENERALE .....	1
<div>CHAPITRE 1 : PRODUCTION, SOURCES, TOXICITE DES PAH ET DES PCB AINSI QUE LEURS VOIES DE DISPARITION DANS L'ECOSYSTEME SOL.</div>	5
1) LES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES (PAH) .....	5
1.1 Définition des PAH .....	5
1.2 Classification, formation et sources des PAH .....	6
2) LES POLYCHLOROBIPHENYLES (PCB) .....	8
2.1 Définition des PCB .....	8
2.2 Sources des PCB .....	8
3) LA TOXICITE .....	9
3.1 La toxicité des PAH .....	9
3.2 La toxicité des PCB .....	9
4) LES PROCESSUS QUI INFLUENCENT LES CONCENTRATIONS DES PAH ET DES PCB DANS LES SOLS .....	9
4.1 L'adsorption sur les éléments constitutifs du sol .	10
4.2 La volatilisation des micropolluants .....	11
4.3 La dégradation photochimique .....	12
4.4 La dégradation microbienne .....	12
4.4.1. La dégradation microbienne des PAH .....	12
4.4.2. La dégradation microbienne des PCB .....	15
<div>CHAPITRE 2 : LA FLUORESCENCE COMME OUTIL ANALYTIQUE DES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES (PAH) : DEVELOP- PEMENT D'UNE METHODE PERMETTANT L'UTILISATION DE CHAMPS DE FLUORESCENCE TOTALE EN ECOTOXICOLOGIE.</div>	17
1) POURQUOI LES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES SONT ILS FLUORESCENTS ? .....	17
2) LES SPECTRES D'EXCITATION ET D'EMISSION .....	18
3) LES CHAMPS DE FLUORESCENCE TOTALE .....	20
3.1 Les champs de fluorescence totaux dans la littérature .....	20
3.2 Le programme d'interpolation de contours (CIP) ....	22
3.3 La réalisation pratique des diagrammes de contours et des champs de fluorescence en 3 dimensions .....	23

3.4 Les échantillons traités par le programme CIP .....	24
4) CRITIQUE DE LA METHODE PROPOSEE .....	31

CHAPITRE 3 : ETUDE DES VOIES DE PENETRATION DE QUELQUES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES DANS LES SOLS AGRICOLES.	33
---	----

1) INTRODUCTION .....	33
2) LES BUTS DE CETTE PARTIE DE LA RECHERCHE .....	34
3) LES RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES .....	35
3.1 Les boues d'épuration .....	35
3.2 Les précipitations atmosphériques .....	37
4) LA CONTAMINATION DES BOUES D'EPURATION .....	39
4.1 Etude des boues de 6 stations d'épuration de Suisse .....	39
4.2 Les fluctuations des concentrations en micro- polluants organiques dans les boues d'épuration au cours du temps .....	42
5) INFLUENCE DE LA PROXIMITE D'UNE ZONE URBAINE DANS LA CONTAMINATION DES SOLS PAR LES PAH ET LES PCB .....	43
6) ETUDE DE LA DYNAMIQUE DES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES SUITE A L'EPANDAGE DE BOUES D'EPURATIONS .....	46
7) LES EFFETS A LONG TERME DE L'EPANDAGE DE BOUES D'EPURA- TION : COMPARAISON AVEC 2 AUTRES TYPES D'AMENDEMENTS .....	53
8) ETUDE DE LA PENETRATION EN PROFONDEUR DES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES DANS LES SOLS .....	56
9) ESTIMATION DE LA CONTAMINATION EN PAH ET EN PCB DES SOLS AGRICOLES PAR LES ENGRAIS DE FERME .....	57
10) ESTIMATION DE LA CONTAMINATION EN PAH ET EN PCB DES SOLS AGRICOLES PAR LES FERTILISANTS MINERAUX ET LES AGENTS DE TRAITEMENT DES CULTURES .....	58
11) CONCLUSIONS DE CETTE PARTIE DE LA RECHERCHE .....	59

CHAPITRE 4 : CONTAMINATION DES SOLS PAR LES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES : APPLICATION DES TESTS RESPIRO- METRIQUES A L'ETUDE DU COMPORTEMENT DE LA MICROFLORE TER- RESTRE.	63
---	----

1) REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DES TESTS RESPIROMETRIQUES .....	63
1.1 Les systèmes à flacons respirométriques .....	64
1.2 Les systèmes à flux discontinu .....	64
1.3 Les systèmes intégrés .....	64

2) POSITION DU PROBLEME ET BUT DE CETTE PARTIE DE LA RECHERCHE .....	65
3) DESCRIPTION DES SOLS ETUDIES .....	66
4) LES MOYENS EXPERIMENTAUX ET LES PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS .....	67
5) LES TESTS RESPIROMETRIQUES .....	68
5.1 Le dispositif respirométrique .....	68
5.2 Les deux tests d'incubation .....	69
5.2.1 Le protocole expérimental du test 1 .....	69
5.2.2 Les resultats du test 1 .....	70
5.2.3 Le protocole expérimental du test 2 .....	74
5.2.4 Les résultats du test 2 .....	77
6) CONCLUSION DE CETTE PARTIE DE LA RECHERCHE .....	92
7) CRITIQUE DES TESTS RESPIROMETRIQUES .....	92

CHAPITRE 5 : ETUDE DU TRANSFERT DES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES DES SOLS VERS LES TISSUS DES LOMBRICIENS.
---

99

1) LES 3 CATEGORIES DE LOMBRICIENS .....	99
2) LA LITTERATURE SCIENTIFIQUE .....	101
3) LE BUT DE CETTE PARTIE DE LA RECHERCHE .....	102
4) L'ACCUMULATION DES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES DANS LES TISSUS DES LOMBRICIENS .....	102
4.1 Difficultés de comparaison de différentes recherches .....	102
4.2 La théorie statique et la théorie dynamique .....	104
5) TRANSFERT DES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES DES SOLS DANS LES TISSUS DES LOMBRICIENS .....	107
5.1 Carence de la littérature .....	107
5.2 Les analyses des champs expérimentaux de la station de Liebefeld .....	108
5.3 Comparaison des proportions de différentes classes de PAH dans les tissus des lombriciens par rapport à celles du sol .....	109
5.4 L'augmentation des proportions d'homologues alkylés du phénanthrène est elle générale dans les tissus des lombriciens ? .....	115
5.5 Les diagrammes de fluorescence totale .....	115
6) CONCLUSION DE CETTE PARTIE DE LA RECHERCHE .....	122

<b>CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS GENERALES</b>	123
BIBLIOGRAPHIE	129
ANNEXE 1 : La conservation des échantillons	159 A
ANNEXE 2 : Les techniques analytiques	163 A
Curriculum vitae	181 A

---

## Introduction générale.

Le développement industriel induit une forte augmentation de la consommation d'énergie et de la production de déchets. Durant ces dernières années de nombreuses institutions, aussi bien publiques que privées, se sont attachées à développer des programmes d'économie d'énergie et de récupération des déchets domestiques et industriels. Des progrès considérables ont été faits dans ces deux domaines, essentiellement parce qu'il s'agit de problèmes perceptibles : on observe l'épuisement des réserves de carburants fossiles et l'augmentation des quantités de déchets.

Cependant la consommation de carburants fossiles et la production de déchets ont des conséquences sournoises :

- production d'hydrocarbures polycycliques aromatiques cancérigènes,
- contamination de tous les écosystèmes de notre planète par des substances possédant des propriétés physico-chimiques remarquables.

Ces propriétés expliquent d'ailleurs leur vaste champ d'utilisation en industrie; les molécules organochlorées comme les polychlorobiphényles en constituent un bon exemple. Comme ces conséquences ne sont pas perceptibles à l'oeil nu, elles sont largement méconnues de l'opinion publique.

Les hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH) et les polychlorobiphényles (PCB) font partie des polluants prioritaires. Qu'entendons nous par ce terme ?

Il s'agit de substances qui satisfont au moins à un des critères suivants :

- Substances réputées cancérigènes, mutagènes ou tératogènes.
- Substances ayant une ressemblance structurale avec celles précitées ou suspectées d'être cancérigènes, mutagènes ou tératogènes.
- Substances présentes dans les effluents industriels qui induisent des effets toxiques envers les êtres humains ou les organismes aquatiques.

L'agence américaine pour la protection de l'environnement (E.P.A.) a sélectionné 129 substances répondant à un ou plusieurs de ces critères [Anthony et al. 1981].

De plus les PAH et les PCB sont des micropolluants organiques peu biodégradables. Ces substances sont soit de nature étrangère au milieu naturel (PCB), soit de nature semblable à celle des fonctions chimiques constitutives du milieu naturel et entrant de ce fait en compétition avec celles-ci (PAH).

Elles engendrent des dommages sanitaires ou écologiques à partir de doses très faibles, généralement inférieures au mg/kg de poids frais des individus. Ces dommages écologiques sont la conséquence, entre autres, de distorsions biochimiques apparaissant sur les mécanismes vitaux de base.

Nous nous sommes proposé d'étudier les sources et la dynamique de quelques polluants prioritaires dans l'écosystème sol.

Du point de vue de la démarche suivie dans ce travail, nous avons préféré faire ressortir une image globale des sources et des cheminements de quelques micropolluants organiques dans l'écosystème sol, plutôt que de détailler l'un ou l'autre de leurs maillons.

Pour obtenir cette vue globale, il a fallu s'intéresser à deux facteurs essentiels :

-Les polluants organiques: nous avons décidé d'étudier simultanément deux familles de polluants, du moins en ce qui concerne l'étude des sources de micropolluants dans les sols. Nous avons estimé cette démarche plus intéressante que celle consistant à étudier une seule famille de façon plus approfondie, car quelles que soient les observations faites dans ce cas, nous n'aurions pas eu de points de comparaison.

Comme première famille de micropolluants organiques nous avons sélectionné les PAH. Les raisons en sont les suivantes :

- .leur production continue par la consommation de carburants fossiles,
- .leur diffusion dans tous les écosystèmes terrestres due à leur présence importante dans les précipitations atmosphériques,
- .la persistance, chez l'homme, de multiples formes de cancers qui peuvent être liées à ces substances.

Comme seconde famille nous avons choisi les PCB :

- .malgré l'interdiction de leur utilisation (sauf cas exceptionnels) dans la plupart des pays industrialisés depuis les années 70, ces polluants continuent encore à pénétrer les écosystèmes sous des formes diffuses,
- .leur persistance est exceptionnellement longue dans les écosystèmes terrestres.

Finalement dans ces deux familles se trouvent plusieurs substances ayant des structures chimiques comparables mais non identiques. Presque toutes les substances d'une même famille peuvent être identifiées au moyen d'une seule analyse mais chaque substance aura en général un comportement différent des autres dans l'environnement. Cette propriété donne un grand intérêt écotoxicologique à ces deux familles.

-Le milieu récepteur: Il s'agit de l'écosystème sol. C'est l'entité biologique illustrant le mieux la complexité d'un écosystème. Il est constitué d'un biotope, en l'occurrence le sol, et d'une biocénose, constituée d'une très grande variété de plantes et d'animaux. Le sol, quant à lui, est un mélange de substances minérales résultant de la décomposition des roches-mères par des agents physiques et chimiques, et de matières organiques particulières produites par la décomposition des résidus végétaux par les agents biologiques [Duvigneaud 1974]. Il n'est pas possible dans le cadre de ce travail de tester les effets des micropolluants organiques sur tous les constituants du milieu récepteur. Il est utile de choisir un bioindicateur, dans notre cas : le lombricien. Il s'agit d'une espèce animale importante dans le milieu terrestre, car elle se situe à une position clef du réseau trophique: elle vit en contact étroit avec les micro-organismes du sol, et elle constitue la nourriture de base de nombreux oiseaux et mammifères.

Si nous présentons une image globale des sources et des cheminements de quelques micropolluants organiques dans l'écosystème sol, nous n'osons cependant prétendre que cette image soit complète. Ainsi nous ne parlerons pas durant ce travail de la pénétration des micropolluants dans les plantes, ni de leur diffusion dans les nappes phréatiques.

Le travail englobera 6 chapitres :

- Le premier chapitre sera consacré à une brève introduction sur les sources et les voies de dégradation dans l'écosystème sol des PAH et des PCB.

- Le second chapitre discutera des adaptations analytiques originales mises au point au cours de ce travail.

- Le troisième chapitre mettra l'accent sur la pondération des différentes sources de micropolluants organiques dans l'écosystème sol.

- Le quatrième chapitre étudiera l'influence des PAH sur la respiration de la microflore du sol au moyen de tests respirométriques.

- Le cinquième chapitre sera consacré au transfert des micropolluants organiques des sols dans les tissus des lombriciens.

- Le sixième chapitre fera la synthèse et énoncera les conclusions générales de ce travail.

---





# CHAPITRE 1

## Productions, sources, toxicité des PAH et des PCB ainsi que leurs voies de disparition dans l'écosystème sol.

### 1) LES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES (PAH)

Il n'est pas possible dans le cadre de ce travail de décrire de façon complète toutes les sources et toutes les conséquences écotoxicologiques qu'entraînent la présence des PAH et des PCB dans l'environnement. Nous devons nous en tenir à l'essentiel. Afin d'approfondir ces sujets nous proposons la lecture des ouvrages de référence suivants :

- pour les PAH : Bjorseth 1983 et Grimmer 1983,
- Pour les PCB : Hutzinger 1974 et Kimbrough 1980.

#### 1.1 Définition des PAH

Les PAH peuvent être définis comme étant des composés organiques contenant deux ou plusieurs noyaux benzéniques fusionnés. Ceux-ci peuvent avoir un ou plusieurs groupements fonctionnels greffés. Le tableau 1 indique les noms et les structures chimiques des 16 PAH dont il sera le plus souvent question durant ce travail.

Tableau 1 : Noms et structures des principaux PAH étudiés dans ce travail.

PAH	FORMULE PLANE	ABR.	FORMULE BRUTE	POIDS MOLEC.	PAH	FORMULE PLANE	ABR.	FORMULE BRUTE	POIDS MOLEC.
Naphthalène		Nph	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	128,19	Chrysène		Chy	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228,30
Acenaphthène		Ace	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	154,21	Benzo(e)pyrène		B(e)P	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,32
Fluorène		F	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	166,23	Benzo(b)fluoranthène		B(b)F	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,32
Phénanthrène		Phe	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,24	Benzo(k)fluoranthène		B(k)F	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,32
Anthracène		An	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,24	Benzo(a)pyrène		B(a)P	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,32
Fluoranthène		Ft	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202,26	Dibenz(a,h)anthracène		DB(a,h)A	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	278,34
Pyrène		Pyr	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202,26	Benzo(g,h,i)peryène		B(g,h,i)P	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276,34
Benzo(a)anthracène		B(a)A	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228,30	Coronène		Cor	C <sub>24</sub> H <sub>12</sub>	300,36

## 1.2 Classification, formation et sources des PAH

Les PAH présents dans notre environnement proviennent d'un ensemble complexe de sources qui sont soit naturelles, soit anthropogéniques (consécutives aux activités humaines). A l'heure actuelle, d'après discussions sont encore en cours quant à l'attribution de tel ou tel PAH à une source précise.

### - Classification "source naturelle - source anthropogénique"

Cette classification est proposée par Lee et al. (1981). Le tableau 2 indique les différents modes de production des PAH qui se rangent dans une de ces deux catégories.

Tableau 2 : Classification des PAH selon Lee et al. (1981).

PAH d'origine naturelle	PAH d'origine anthropogénique
<ul style="list-style-type: none"><li>- Origine diagénétique (ex.: les synthèses biologiques et les transformations sur des périodes géologiques de molécules organiques.)</li><li>- Combustions naturelles.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Synthèses industrielles.</li><li>- Gaspillages de produits pétroliers.</li><li>- Chauffages au moyen de carburants fossiles.</li><li>- Gaz d'échappements.</li></ul>

Le pétrole est un mélange très complexe d'hydrocarbures qui sont principalement des alcanes primaires et des cycloalcanes, mais qui contient aussi une quantité variable de PAH. Ces PAH sont dits "d'origine diagénétique" [Wakeham et al., 1980b].

La figure 1 montre que les homologues du phénanthrène les plus abondants dans le pétrole sont ceux qui possèdent les plus forts taux d'alkylation.

Cette répartition des degrés d'alkylation dans les pétroles contraste très fort avec celle observée dans les substances provenant de processus de combustion. Parmi ceux-ci on peut citer les feux de forêts et de prairies. Ils forment aussi une importante source de PAH naturels [Blumer et al. 1975, Youngblood et al. 1975]. La figure 1 montre que la majeure partie des PAH contenus dans les fumées d'incinération du bois sont non substitués.

Pour les PAH anthropogéniques ce sont surtout les systèmes de chauffage utilisant des carburants fossiles (appelés aussi produits géochimiques) qui forment la principale source de formation de ces substances. Actuellement les mécanismes de formation ne sont pas entièrement compris. On suppose que les réactions chimiques ont lieu en deux étapes distinctes, respectivement la pyrolyse et la pyrosynthèse. A haute température, les substances organiques géochimiques sont partiellement brisées en plus petites molécules instables (pyrolyse). Ces fragments, la plupart du temps des radicaux [Smith 1979], se recombinent en molécules plus larges et plus stables (pyrosynthèse) pour finalement former des PAH. La figure 1 montre que les réactions de pyrolyse et de pyrosynthèse ont

pour effet de diminuer sensiblement la longueur des chaînes alkyles des PAH contenus dans les carburants fossiles puisque les gaz d'échappement restituent dans l'atmosphère des PAH à 1 ou 2 carbones alkyles. Les PAH à 5 carbones alkyles, si abondants dans le pétrole, sont presque totalement absents des gaz d'échappement de moteurs utilisant ces carburants fossiles.

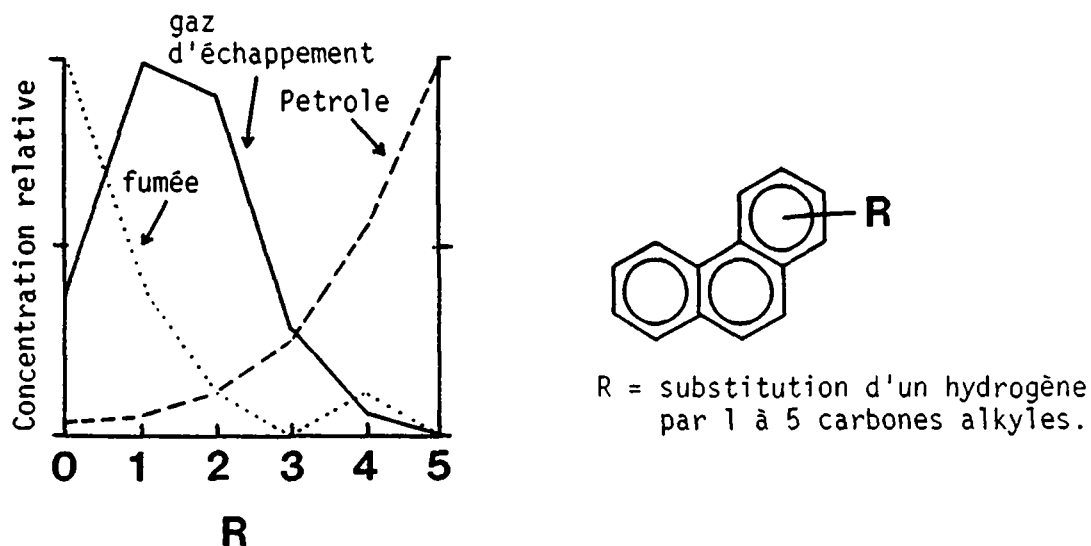


Figure 1 : Distribution des homologues alkylés du phénanthrène ( $C_{12}H_{10}R_n$ ) dans un échantillon de pétrole brut (---) dans les gaz d'échappement de véhicules (—) et dans les fumées de combustion du bois (.....). L'abondance relative de l'homologue le plus abondant dans chaque échantillon est normalisée à 100 [Simoneit 1985].

La synthèse industrielle de PAH est une forme exceptionnelle de production de ces substances. Seuls l'anthracène, le pyrène ou le carbazole sont produits sous forme pure comme produits de base de colorants, pesticides, herbicides ou produits pharmaceutiques [Zander 1980].

Wakeham et al. (1980b) ont effectué une synthèse de la répartition des PAH naturels et anthropogéniques dans les sédiments de 3 lacs Suisses et d'un lac américain. Ils constatent que les sédiments superficiels contiennent jusqu'à 40 fois plus de PAH en comparaison des couches plus profondes. Cette augmentation de concentration correspond à la croissance de l'industrialisation et de l'urbanisation. Peu de PAH ont été détectés dans des couches sédimentaires datant d'avant la révolution industrielle. La plupart des PAH des couches superficielles ont donc une origine anthropogénique provenant principalement des produits de combustion de carburants fossiles [Hites et al. 1977, Laflamme et al. 1978, Wakeham et al. 1980a] et du gaspillage de produits pétroliers [Teal et al. 1978].

De l'ensemble des publications précédentes il ressort qu'aussi bien des PAH méthylés que non-méthylés peuvent être présents dans les sources naturelles et anthropogéniques. Cependant les proportions de ces deux groupes de PAH varient en fonction du type de source. Les PAH d'origine anthropogénique sont principalement des PAH non substitués caractéristiques des processus pyrogéniques des chauffages [Lee et al. 1977].

## 2) LES POLYCHLOROBIPHENYLES (PCB)

### 2.1 Définition des PCB

Les PCB sont des dérivés de substitution du noyau diphenyle par un nombre variable d'atomes de chlore, compris entre 1 et 10. Un exemple est illustré à la figure 2.

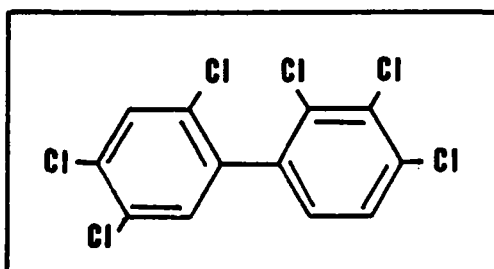


Figure 2 : structure du 2,3,4,2'4'5'-hexachlorobiphényle

### 2.2 Sources des PCB

Par opposition aux PAH, les PCB proviennent exclusivement de sources anthropogéniques. Avant 1920 on ne les trouvait nulle part, alors qu'actuellement il n'y a presque plus d'endroit sur la planète qui ne soit peu ou pas contaminé par ces substances. Les PCB sont typiquement des produits commerciaux. Ils ont connu une large diffusion, étant donné leur faible coût, leur haute stabilité chimique, leur pouvoir diélectrique important et leur résistance aux températures élevées. Leurs principales utilisations sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Principales utilisations des PCB [Hutzinger 1974].

Catégorie d'utilisation	Utilisation
<i>Systèmes contrôlés clos:</i>	Fluide diélectrique dans les transformateurs et les grands condensateurs.
<i>Systèmes non contrôlés clos:</i>	Fluide caloporteur, fluide hydraulique, petits condensateurs, ...
<i>Systèmes ouverts:</i>	Huiles lubrifiantes, huiles de coupe, plastifiants, anti-feu, additif de pesticide, ...

Le premier à avoir mis en évidence la contamination de l'environnement par ces substances est Jensen en 1966 en effectuant des analyses sur des poissons de la Baltique (Jensen 1972).

Pour qu'une diffusion aussi large d'un polluant organique anthropogénique puisse être observée à travers le monde il faut réunir quatre facteurs essentiels :

- une production massive de la substance en question,
- une stabilité physique, chimique et biologique du produit,
- une certaine volatilité de ce produit,
- un transport du produit par les courants atmosphériques et par les précipitations.

### 3) TOXICOLOGIE

#### **3.1. La toxicité des PAH**

La toxicité aiguë des PAH est faible. De nombreux PAH sont cancérigènes [Conney 1982]. Cette cancérogénicité peut être stimulée par d'autres substances tels que des alcanes à longues chaînes. L'être humain étant exposé chaque jour à une multitude de substances chimiques dans l'environnement, il est très difficile de déduire des relations de cause à effet pour un PAH spécifique.

Il est maintenant établi que c'est la réaction des produits cancérigènes sur les cellules d'acides nucléiques qui est à l'origine des cancers. Ce qui est encore mal connu, c'est quel est exactement le mécanisme qui est responsable de ceux-ci :

- soit que l'acide désoxyribonucléique (ADN) est altéré,
- soit que l'acide ribonucléique est altéré et à son tour altère l'ADN.

#### **3.2. La toxicité des PCB**

Comme celle des PAH, la toxicité aigue des PCB est faible. Les critères de toxicité à long terme reposent principalement sur les points suivants [Monod G. 1983]:

- Les PCB sont des inducteurs enzymatiques puissants.
- Les PCB ont des effets immuno-modulateurs.
- Contrairement aux PAH, si les PCB sont de faibles cancérigènes, il peuvent tout de même augmenter la croissance tumorale.

Il est utile de signaler que des études toxicologiques sérieuses des PAH et des PCB doivent prendre en compte les différences de toxicité pouvant exister d'un isomère à un autre. (phénanthrène-anthracène comme exemple pour les PAH; 2,4'- et 4,4'-dichlorobiphényles comme exemple pour les PCB)

### 4) LES PROCESSUS QUI INFLUENCENT LES CONCENTRATIONS DES PAH ET PCB DANS LES SOLS

Nous serons amenés à étudier les modifications de concentrations des PAH et des PCB dans les sols suite à l'épandage de boues d'épuration des eaux. Les concentrations de ces micropolluants se modifieront au cours du temps. Il nous a

semblé utile d'effectuer une description sommaire des 4 processus qui influencent leur comportement dans les sols.

- L'adsorption sur les éléments constitutifs du sol,
- La volatilisation des micropolluants,
- La dégradation photochimique,
- La dégradation microbienne.

#### 4.1. L'adsorption sur les éléments constitutifs du sol

Les phénomènes d'adsorption des micropolluants organiques sur les éléments constitutifs d'un sol dépendent simultanément de paramètres physico-chimiques propres au sol et du micropolluant organique lui-même.

Du point de vue des paramètres propres au sol le coefficient d'adsorption ( $K_{oc}$ ) d'un micropolluant est principalement fonction de la teneur en carbone organique du sol. Cependant les paramètres propres au sol sont tellement complexes que certains chercheurs ont établi une échelle relative, comparant les capacités d'adsorption des micropolluants organiques les uns par rapport aux autres, n'utilisant que des paramètres physico-chimiques propres à ces polluants. Cette échelle est valable pour un très grand nombre de sols.

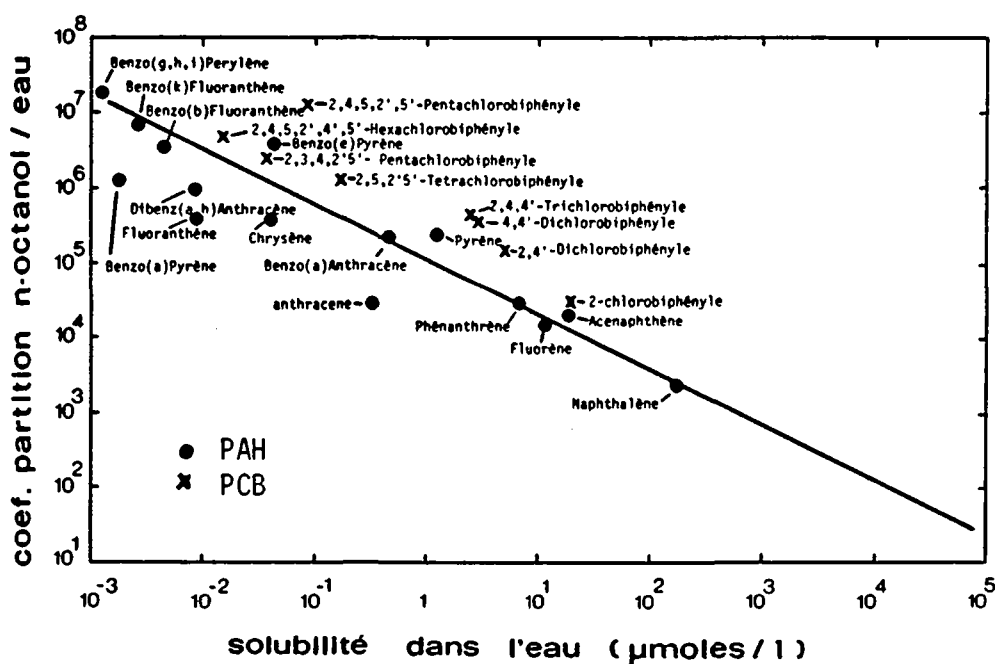


Figure 3 : Relation entre la solubilité dans l'eau et les coefficients de partition ( $K_{ow}$ ) de quelques PAH et PCB. D'après les valeurs de Weast (1980), Sims (1983) et Sklarew et al. (1987).

Le paramètre physique le plus souvent utilisé est le coefficient de partition octanol-eau ( $K_{ow}$ ) qui s'exprime comme suit :

$$K_{ow} = \frac{\text{Concentration du polluant dans l'octanol}}{\text{Concentration du polluant dans l'eau}}$$

Le logarithme de cette valeur est inversement proportionnel à la solubilité dans l'eau pour une large variété de substances organiques, incluant des hydrocarbures aromatiques, des acides aromatiques, des pesticides organochlorés et organophosphorés et des PCB [Chiou et al. 1977]. D'autre part il est proportionnel au coefficient d'adsorption des micropolluants organiques dans les sols (Koc). La simple connaissance empirique de Kow nous dira si un polluant sera fortement retenu par les particules du sol ou non [Karickhoff 1981]. La figure 3 illustre cette relation pour quelques PAH et PCB. On déduit de la figure 3 que le benzo(g,h,i)pérylène sera plus fortement retenu que les autres PAH dans un même type de sol. C'est principalement l'importance du poids moléculaire des PAH et des PCB qui règle leur rémanence sur les sols.

#### 4.2 La volatilisation des micropolluants

La volatilisation d'un micropolluant est tout d'abord fonction de ses propriétés physico-chimiques, mais aussi de la température de l'air et du sol, ainsi que de la teneur en humidité et de la vitesse des gaz à travers le sol et l'air [Thibodeaux 1981].

La volatilisation des micropolluants organiques est nettement inférieure à partir de sols, qu'à partir de l'eau [Kilzer et al. 1970]. En général la volatilisation diminue avec l'augmentation du nombre de cycles et de groupements fonctionnels pour les PAH, et avec l'augmentation du nombre de chlores pour les PCB [Pal et al. 1980]. En ce qui concerne les PAH, la volatilisation se ferait à partir de la fraction non adsorbée de ces polluants [Sims et al. 1983]. Le naphthalène se sublimerait même en grande partie. En général la tendance à la volatilisation de la plupart des PAH serait faible. Par contre pour les PCB ce processus serait le principal responsable de la contamination des végétaux par ces polluants [Bacci et al. 1985].

#### 4.3 La dégradation photochimique

Dans l'environnement, la seule source de radiation naturelle est la lumière du soleil. Son énergie devient faible en dessous de 290 nm. Il s'en suit que seules les liaisons des molécules des micropolluants organiques ayant une énergie de rupture correspondant à des radiations supérieures à ces 290 nm pourront subir une photodégradation naturelle.

La figure 4, légèrement modifiée, de Tarradellas (1984), compare l'énergie des radiations électromagnétiques avec celle de quelques liaisons chimiques. La partie tramée correspond au domaine de longueurs d'ondes non couvert par les radiations naturelles du soleil. On remarque qu'un cycle benzénique aura fort peu de chances d'être dégradé photochimiquement. Par contre les cycles benzéniques conjugués, se trouvent en plein dans la zone des radiations du soleil. On comprend mieux à présent pourquoi cette catégorie de substances est tellement sensible aux dégradations photochimiques.

Plus que le poids moléculaire des PAH, ce sera d'avantage la présence ou l'absence de substituants alkyles qui détermineront la dégradabilité photochimique de ces substances.

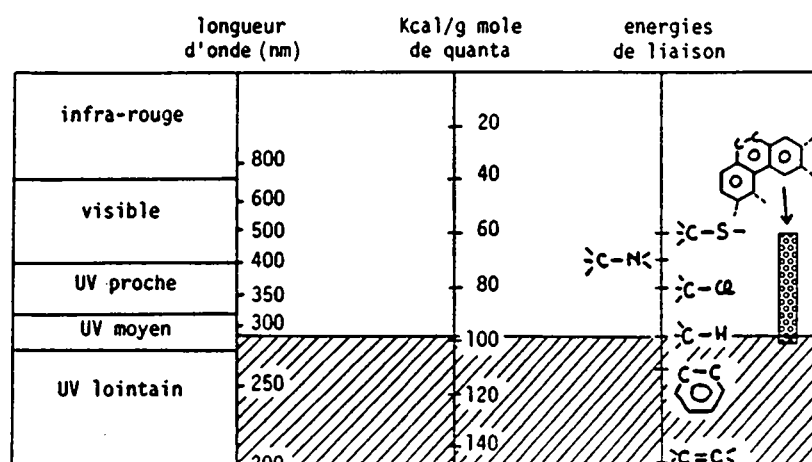


Figure 4 : Comparaison de l'énergie des radiations électromagnétiques avec celle de quelques liaisons chimiques.

Dans l'eau les dégradations photochimiques des PAH sont une fonction linéaire de l'intensité lumineuse. Ce processus dépend aussi fortement de la présence d'oxygène et de la température du milieu [Radding et al. 1976]. Il s'effectue avec une cinétique de premier ordre [Mill 1980].

A partir du moment où les micropolluants organiques sont adsorbés sur des constituants du sol, leur dégradation photochimique est stimulée dans certains cas [Radding et al. 1976, Hansch 1980, Zepp 1980] et inhibée dans d'autres [Radding et al. 1976, Hansch 1980, Sims 1983].

#### 4.4 La dégradation microbienne

##### 4.4.1. La dégradation microbienne des PAH.

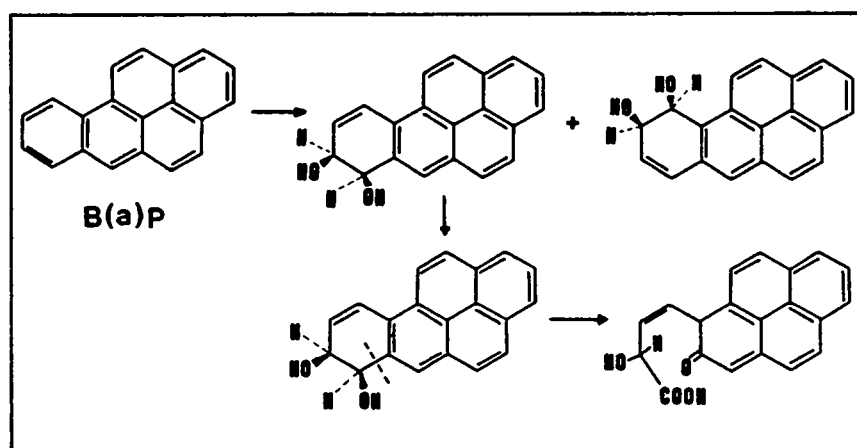


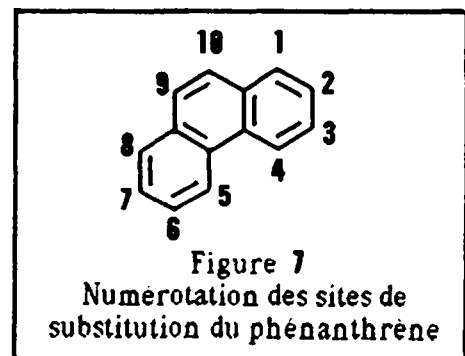
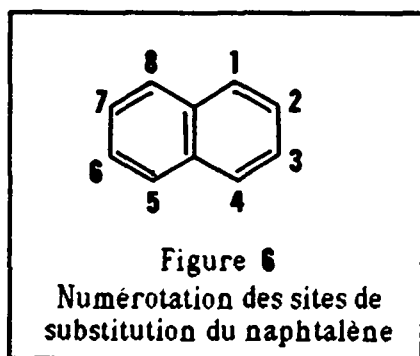
Figure 5 : Une des voies de dégradation du benzo(a)pyrène par les micro-organismes [Conney 1982].



Les dégradations microbiennes des PAH sont assez bien connues et ont fait l'objet de quelques publications [Hopper D.J. 1978, Gibson 1983]. Elles constituent une des voies d'élimination les plus importantes de ces substances des sédiments marins. Le mécanisme de dégradation est similaire pour un bon nombre de PAH (Figure 5). En premier lieu ils sont convertis en dihydrodiols (en position ortho l'un par rapport à l'autre), puis en dérivés hydroxycarboxylates par clivage enzymatique du cycle oxydé.

La dégradation des PAH est cependant fortement influencée par la présence de substituants alkyles sur les cycles condensés. Trois groupes de PAH ont fait l'objet de recherches plus approfondies à ce sujet : le naphthalène, le phénanthrène et le chrysène :

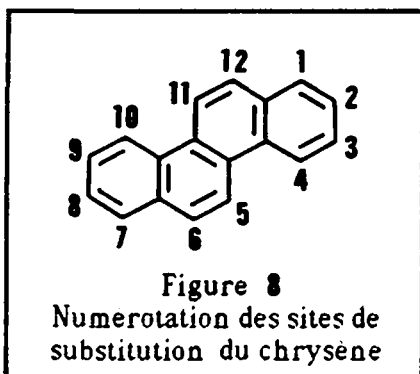
Le naphthalène (Figure 6): Volkman (1984) observe que les éthyl-naphthalènes sont bien plus résistants à la biodégradation que la plupart des diméthyl-naphthalènes. Parmi ces derniers ce sont ceux qui ont des positions adjacentes qui sont les plus résistants, en particulier les 2,3- et 1,8- diméthyl-naphthalènes. Solanas et al. (1984) observent la même chose in vitro sur des échantillons de pétroles bruts.



Le phénanthrène (Figure 7): Le phénanthrène pur est inactif du point de vue cancérigène ou mutagène. Certains dérivés alkylés de ces PAH sont par contre biologiquement très actifs. Bayona et al. (1986) mettent en évidence que *Pseudomonas* dégrade sélectivement le 3- et le 2-méthyl-phénanthrène et laisse à peu près intact le 9-méthyl-phénanthrène dans un échantillon de pétrole brut arabe. Les proportions de l'ensemble des dérivés méthylés par rapport au phénanthrène non substitué dépendent fortement des températures de pyrolyse [Adams et al. 1982].

Globalement il y a une diminution du degré d'alkylation en fonction de l'augmentation de la température. Du point de vue environnement une conséquence pratique est observée à partir de ce phénomène. Mille et al. (1982) observent que le rapport des concentrations phénanthrène/méthyl-phénanthrène dans les sédiments côtiers de la Méditerranée est toujours nettement inférieur à 1, démontrant ainsi une pollution par les PAH d'origine pétrolière. La seule période de l'année où ce rapport s'inverse est en hiver, période durant laquelle les sédiments sont fort contaminés par des PAH non méthylés provenant des systèmes de chauffage.

Le chrysène (Figure 8): Tout comme pour le phénanthrène, le 3- et le 2-méthylchrysène sont sélectivement dégradés par *Pseudomonas* [Bayonna et al. 1986]. Hoffman et al. (1974) observent que le 3- et le 6 méthylchrysènes sont de puissants inducteurs de tumeurs et que le 5-méthylchrysène est lui hautement cancérigène. Les autres alkylchrysènes sont relativement inactifs.



Ces quelques informations permettent de constater qu'on connaît encore peu de choses sur la relation existant entre la structure des PAH, leur dégradabilité et leur écotoxicité. Or ces relations sont de la plus haute importance pour bien saisir la biodisponibilité de ces substances dans l'environnement. Ainsi Farrington (1986) a constaté que des moules et des vers polychètes contenaient systématiquement des proportions de PAH méthylés nettement plus importantes que celles de PAH non méthylés détectées dans les sédiments superficiels dans lesquels ces invertébrés vivent [Farrington 1983, 1986, Farrington et al. 1982, 1983 et 1986]. Afin d'expliquer ce phénomène nous avons repris la figure 9 tirée de la publication de Farrington 1986.

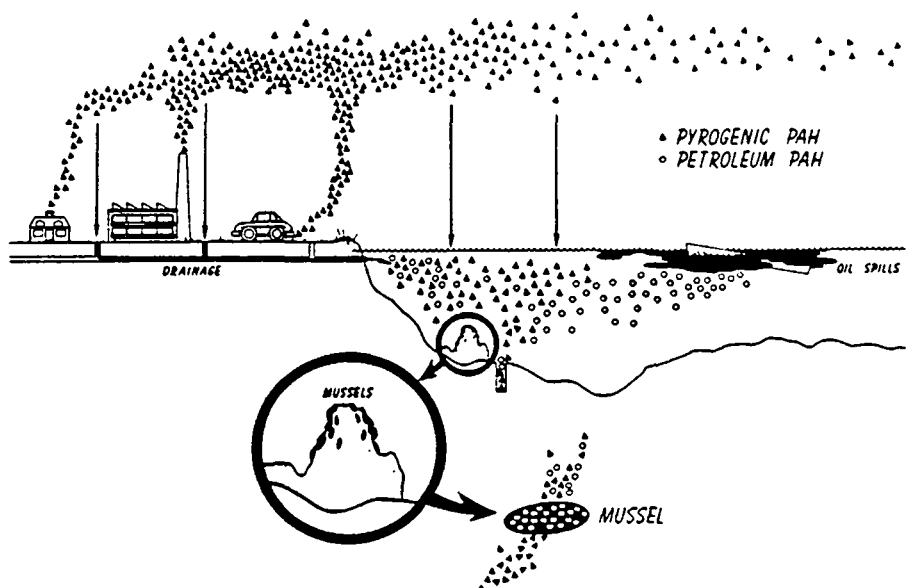


Figure 9 : Schéma représentant la plus grande biodisponibilité des PAH pétroliers (géochimiques) par rapport à celle des PAH pyrogéniques vis à vis des moules [Farrington 1986].

Farrington explique que les PAH peuvent être classés en deux catégories dites "PAH d'origine pétrolière ou géochimique" et "PAH d'origine pyrogénique" (Tableau 4). Ces derniers sont des

PAH à dominance non méthylée. Les hautes températures auxquelles ils sont produits font qu'ils sont fortement liés ou incorporés à des particules solides présentes dans l'atmosphère.

Une fois ces particules retombées en mer et accumulées sur la couche superficielle des sédiments marins, ces PAH d'origine pyrogénique seront nettement moins biodisponibles que ceux d'origine géochimique. Ceux-ci sont à prédominance méthylée. Ils pénètrent les écosystèmes sous forme soluble, colloïdale ou faiblement adsorbée sur des particules solides.

Tableau 4 : Classification des PAH selon Farrington (1986).

PAH d'origine géochimique	PAH d'origine pyrogénique
<u>PAH A DOMINANCE METHYLEE</u>	<u>PAH A DOMINANCE NON METHYLEE</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- PAH diagénétiques.</li> <li>- Dégénérations à long terme. de tissus biologiques.</li> <li>- Gaspillages de produits pétroliers.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Synthèses industrielles.</li> <li>- Combustions naturelles.</li> <li>- Combustions anthropogéniques. (chauffages, gaz d'échappement)</li> </ul>

Nous pouvons constater que les positions des substituants méthyles ainsi que le degré de substitution des PAH jouent un rôle déterminant dans la dégradabilité et donc dans la biodisponibilité de ces substances.

#### 4.4.2 La dégradation microbienne des PCB.

Actuellement les voies de dégradation microbiennes des PCB ne sont encore que partiellement connues [Fries et al. 1984, Hankin et al. 1984]. Elles sont à mettre en parallèle avec celles du biphenyle. Nous nous aiderons de la figure 10 pour mieux comprendre la dégradation comparative de ces deux substances.

Les biphenyles suivent une voie de dégradation métabolique durant laquelle les micro-organismes utilisent les produits de dégradation comme source énergétique. Par contre les PCB suivent une voie de dégradation cométabolique durant laquelle cette utilisation n'est pas possible [Focht et al. 1987]. On sait depuis plus de 10 années déjà que les premières étapes de dégradation du biphenyle et du 4,4'-dichlorobiphenyle sont identiques et qu'elles se font par l'intermédiaire d'enzymes de faible spécificité [Lunt et al. 1970, Ahmed et al. 1973]. Comme pour les PAH elles débutent par la formation d'un dihydrodiol (Figure 10).

Une fois que la fission d'un des deux cycles de ces deux substances a eu lieu, les étapes de dégradation microbiennes subséquentes se font par des intermédiaires enzymatiques bien plus spécifiques. A partir de cet instant les produits de cométabolisation des PCB ne peuvent plus être déhalogénés par des bactéries propres aux biphenyles. Il y aurait donc 2 populations microbiennes distinctes qui dégraderaient les PCB, celle qui oxyde le cycle aromatique et celle qui déhalogène les produits d'oxydation du cycle aromatique.

La figure 11 montre que l'encombrement de la molécule de PCB joue un rôle déterminant dans la dégradation microbienne de cette substance dans les sols.

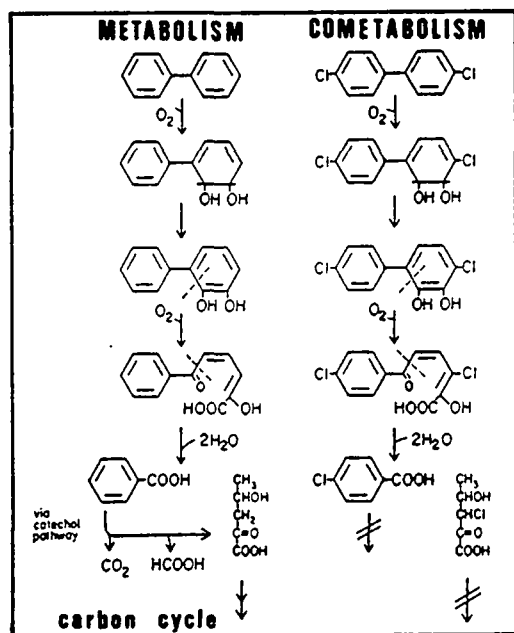


Figure 10: Métabolisme du biphényle et cométabolisation du 4,4'-dichlorobiphényle en cultures microbiennes pures [Focht 1987].

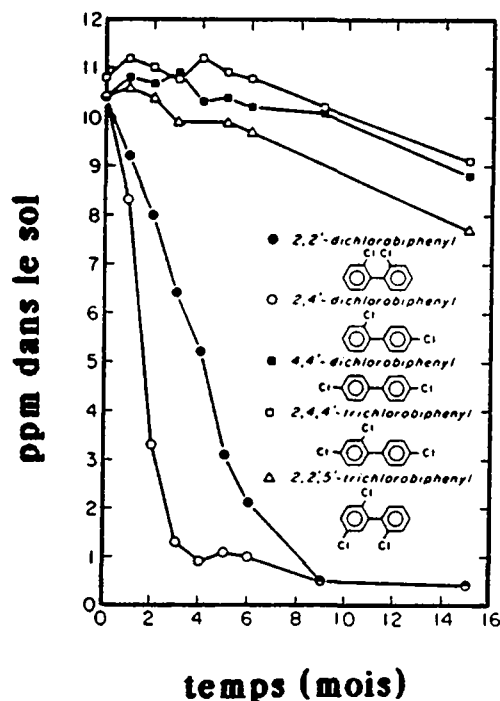


Figure 11: Vitesse de dégradation de quelques isomères de PCB par les micro-organismes du sol [Montgomery 1979].

Cette revue bibliographique doit finalement nous rendre attentifs au fait que 3 sortes de facteurs peuvent intervenir simultanément dans la disparition ou la persistance plus ou moins longue des PAH et des PCB dans les sols : ceux liés au sol, au type de polluant et à la climatologie.

## CHAPITRE 2

# La fluorescence comme outil analytique des hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH) : développement d'une méthode permettant l'utilisation de champs de fluorescence totale en écotoxicologie.

La spectroscopie de fluorescence, adaptée sous forme de détecteur de substances fluorescentes, a été abondamment utilisée dans plusieurs travaux de recherche ayant amené à la présente thèse. Dans un premier temps ce chapitre mettra en relation les structures électroniques des PAH avec leurs propriétés fluorescentes. Une conséquence de celles-ci est l'obtention de spectres d'excitation et d'émission couramment utilisés pour l'analyse qualitative des PAH. Leurs positions respectives dans la configuration globale du champ de fluorescence totale sont décrites.

Toute la suite du chapitre est basée sur l'élaboration d'une procédure permettant une représentation en 3 dimensions de la fluorescence totale d'échantillons contenant des PAH. Cette représentation est obtenue au moyen d'un programme initialement créé pour des utilisations en géodésie et en photogrammétrie.

### 1. POURQUOI LES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES (PAH) SONT-ILS FLUORESCENTS ?

Les PAH, micropolluants organiques dont nous allons étudier le comportement dans l'environnement, sont des substances caractérisées par la présence de nombreuses doubles liaisons carbone-carbone comme en témoigne la figure 12. Qui dit double liaison, dit présence d'orbitales  $\pi$ . Lorsqu'un électron d'une orbitale  $\pi$  liante absorbe une quantité d'énergie, il est promu dans une orbitale antiliante  $\pi^*$  du premier niveau excité.

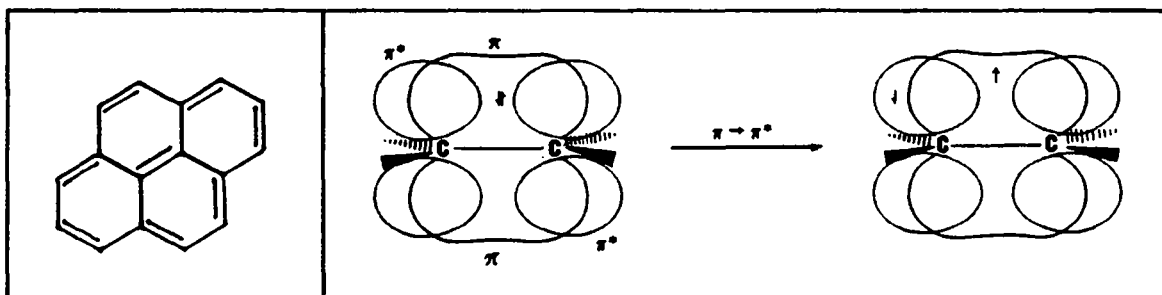


Figure 12 : Les 8 doubles liaisons du pyrène et la position des électrons de valence dans les orbitales moléculaires lors d'une transition énergétique  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

Les électrons  $\pi$  sont bien moins fortement retenus que des électrons  $\sigma$ . Ils peuvent être promus dans des orbitales  $\pi^*$  antiliantes par absorption de quantités d'énergie relativement faibles. Une source ultraviolette est suffisante. Les rayonnements excitants se situent généralement entre 254 nm

(naphthalène) et 333 nm (pyrène). De plus l'intensité de la bande d'absorption de la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  d'une double liaison carbone-carbone d'un PAH est très favorable. Cette intensité est exprimée par le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$  tiré de la Loi de Lambert-Beer :

$$\epsilon = (\log I_0 / I) / c.l$$

Dans cette expression,  $I_0$  est l'intensité lumineuse incidente,  $I$  l'intensité lumineuse transmise,  $c$  la concentration molaire de la substance à étudier et  $l$  la longueur, en cm, de la solution traversée. Dans le cas de la double liaison carbone-carbone,  $\epsilon$  vaut environ  $10^4$  ; par contre dans un groupement carbonyle, possédant également des orbitales  $\pi$ , il s'élève seulement à  $10^3$ . Les PAH sont donc des substances hautement fluorescentes. En général la grande majorité des substances fluorescentes sont aromatiques.

Les transitions impliquant le transfert d'électrons  $\sigma$  (électrons entrant en jeu dans une simple liaison carbone-carbone) ont lieu à des énergies bien plus élevées. Il en résulte que les molécules dans lesquelles tous les électrons sont utilisés dans des liaisons  $\sigma$  ne présenteront pas de bande d'absorption dans l'ultraviolet proche ( $\lambda > 200$  nm). C'est le cas des hydrocarbures saturés (méthane, cyclohexane, par exemple) qui ne présentent de bandes d'absorption qu'au-dessous de 140 nm.

## 2. LES SPECTRES D'EXCITATION ET D'EMISSION.

Les notions d'excitation (ou absorption d'énergie) et d'émission (ou restitution d'énergie) sont très importantes car ce sont elles qui vont nous donner des indications qualitatives précieuses concernant la répartition de certaines substances dans des échantillons de l'environnement. Ces indications seront obtenues soit en examinant séparément les spectres d'excitation et d'émission, soit en les englobant dans une matrice tridimensionnelle.

Qu'entendons-nous par spectre d'excitation et d'émission ?

La transition de l'énergie du niveau énergétique fondamental vers le premier niveau excité, la transition 0-0, est commune aux phénomènes d'excitation et d'émission. Le spectre d'émission devrait donc parfaitement coïncider avec le spectre d'absorption à la longueur d'onde correspondant à la transition 0-0, caractéristique de la fluorescence. En pratique la transition 0-0 du spectre d'excitation et d'émission coïncide rarement exactement. La différence représente une faible perte d'énergie par l'interaction des molécules absorbantes avec le solvant environnant. Pour cette raison l'allure des spectres d'émission ne sera jamais tout à fait identique à celle des spectres d'excitation.

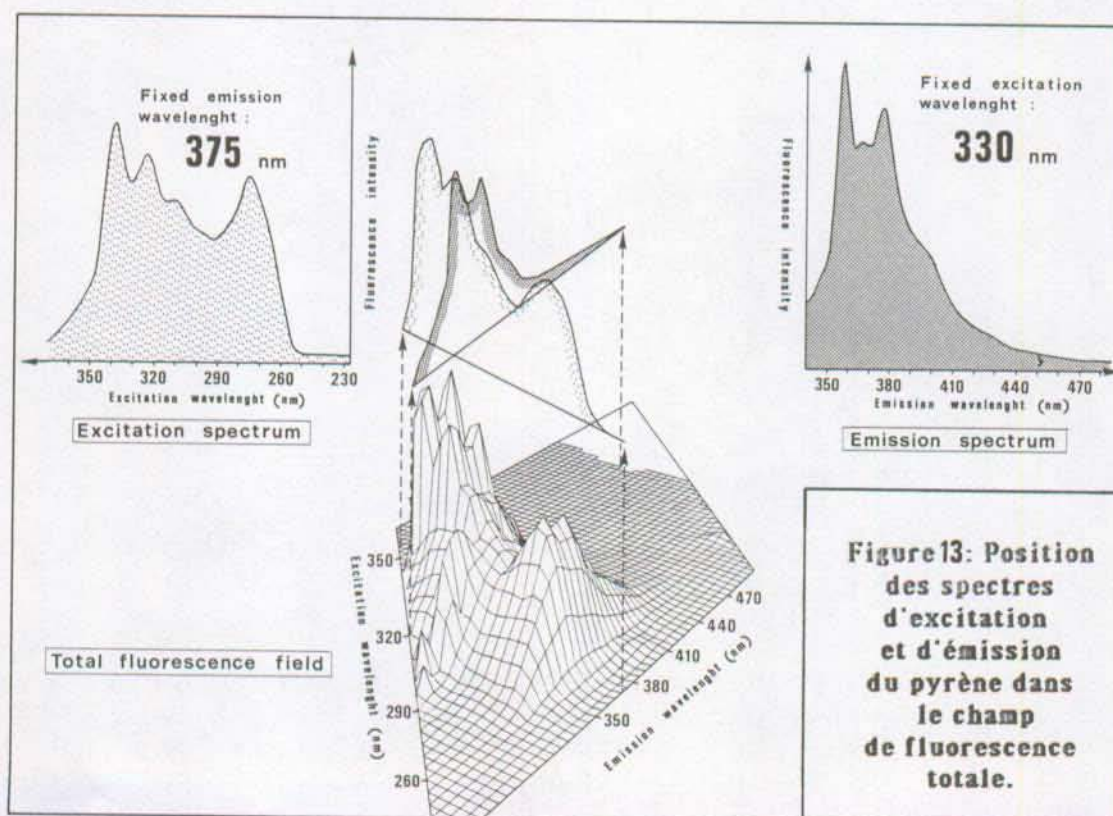
En plus, les molécules de PAH de structures différentes auront chacune un spectre d'excitation et d'émission propre, qui seront en quelque sorte leur empreinte digitale.



- La courbe de l'intensité d'excitation en fonction de la longueur d'onde d'excitation et pour une longueur d'onde d'émission fixe est appelée spectre d'excitation pour cette longueur d'onde d'émission. Ainsi le spectre d'excitation du pyrène enregistré à 375 nm d'émission est représenté sur la figure 13 en haut à gauche.

- Inversément la courbe de l'intensité d'émission en fonction de la longueur d'onde d'émission et pour une longueur d'onde d'excitation fixe est appelée spectre d'émission pour cette longueur d'onde d'excitation. Ainsi le spectre d'émission du pyrène enregistré à 330 nm d'excitation est représenté sur la figure 13 en haut à droite.

Les spectres d'excitation et d'émission ne peuvent être totalement compris qu'en les replaçant dans leur matrice tridimensionnelle où l'axe des X représente les longueurs d'ondes d'émission, l'axe des y les longueurs d'ondes d'excitation et l'axe des z l'intensité de fluorescence. La figure 13 montre la position des spectres d'excitation et d'émission du pyrène dans le champ de fluorescence total de ce produit. Ces spectres sont en fait des sections perpendiculaires dans le champ de fluorescence total. Tout comme les spectres d'excitation et d'émission, le champ de fluorescence total aura une structure propre pour chaque molécule de PAH.



Si deux échantillons ont des proportions de PAH différentes, ils présenteront des champs de fluorescence totale différents. C'est sur ce principe-là que nous allons travailler pour étudier des échantillons corrélatifs de l'écosystème terrestre.

### 3. LES CHAMPS DE FLUORESCENCE TOTAUX.

Nous traiterons au total 7 échantillons afin d'obtenir des champs de fluorescence totaux. Dans ce chapitre nous nous attarderons d'avantage à la technique de réalisation de ces champs de fluorescence qu'à leur utilité en écotoxicologie. Ce dernier point sera étudié dans le chapitre consacré au transfert des PAH des sols dans les tissus des lombriciens (chapitre 5).

#### **3.1. Les champs de fluorescence totaux dans la littérature scientifique.**

La première tentative d'énumération du nombre de composés présents dans des systèmes complexes au moyen de spectrophotométrie de fluorescence a été effectuée par Weber (1961). Freegarde et al. (1971) ont été les premiers à réaliser des diagrammes de contour dans lesquels les contours de mêmes intensités de fluorescence sont représentés en fonction des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission. Un exemple de ce genre de diagramme est illustré sur la figure 14, tirée de la publication de Bentz (1976).

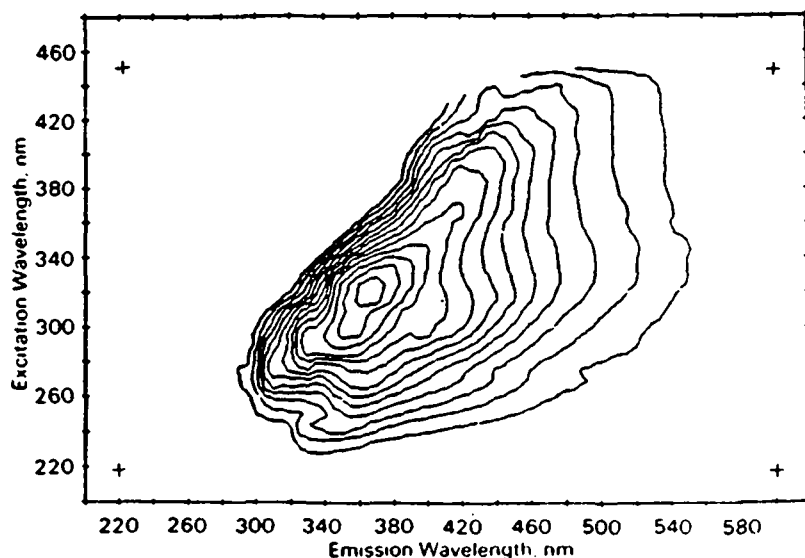


Figure 14: Diagramme de contour d'un spectre de fluorescence total d'un échantillon de pétrole brut de Louisiane. (Bentz 1976)

Une version automatisée de cette procédure, appelée "luminescence totale", fut développée par certains auteurs [Rho et al. 1978; Talmi et al. 1978]. Ces diagrammes de contour ont eu de nombreuses applications en environnement et tout particulièrement dans l'identification de résidus de pétroles bruts [Freegarde et al. 1971, Bentz 1976].



Les pétroles bruts contiennent entre autre un mélange très complexe de PAH. La fluorescence naturelle de ces pétroles est détectée de manière extrêmement sensible. Une fois rejetés en mer, la plupart de ces PAH restent relativement stables, inclus dans la masse de pétrole. Ils ne sont pas particulièrement volatiles, ni solubles. Ces observations font que leur spectre de fluorescence reste relativement stable et qu'il résiste quelques jours aux conditions climatiques. Ces quelques jours sont parfois suffisants pour que les services de surveillance côtière puissent comparer un rejet de pétrole à des résidus présents dans les cales d'un pétrolier suspect. C'est une technique utilisée de manière courante par les gardes-côtes et la police portuaire de divers états américains.

Les reproductions en perspective (3 dimensions) de spectres de fluorescence totale ont été utilisées pour la première fois en 1977 et ensuite à plusieurs reprises par différents groupes de chercheurs [Warner et al. 1977a et b; Talmi et al. 1978; HO et al. 1980; Christian et al. 1981]. Ces reproductions sont complémentaires des diagrammes de contours, ils sont par contre moins utilisables si on désire localiser avec précision des maxima de fluorescence. Un exemple est illustré à la figure 15.

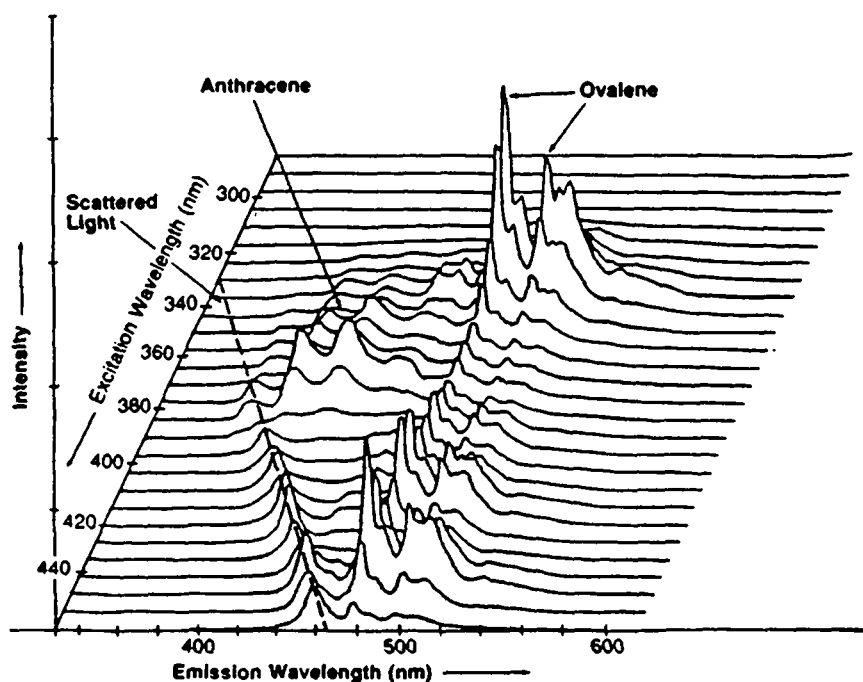


Figure 15: Vue en perspective de la fluorescence totale d'un mélange d'anthracène et d'ovalène (Talmi et al. 1978).

### 3.2. Le programme d'interpolation de contours (CIP).

A notre connaissance les diagrammes de contours et les reproductions en perspective de la fluorescence totale n'ont encore jamais été réalisés sur des échantillons de l'écosystème terrestre. Nous avons songé à les réaliser, premièrement pour combler une lacune, et deuxièmement pour tenter d'expliquer certains phénomènes dans le transfert de PAH présent dans les sols vers les tissus des lombriciens.

Le grand problème dans la réalisation de diagrammes de fluorescence totale et l'automatisation de cette procédure est qu'il faut s'équiper d'un appareillage sophistiqué et coûteux. Il consiste en un détecteur, formé de diodes en série, capable d'enregistrer simultanément toutes les longueurs d'ondes d'émission d'un PAH irradié par une multitude de longueurs d'ondes d'excitation. Le champ de fluorescence complet est obtenu après seulement quelques dizaines de millisecondes. Ne possédant pas cet appareillage, nous avons cependant trouvé une solution auprès du laboratoire de photogrammétrie de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne.

Le programme utilisé pour la réalisation des figures de fluorescence totale en 3 dimensions s'appelle "CIP". Ce sont les premières lettres de Contour Interpolation Program. Il a été réalisé par la firme Wild située à Heerbrugg en Suisse [Steidler 1986]. C'est en fait un programme spécialement créé pour des utilisations en géodésie et en photogrammétrie. Les géomètres ont à coeur d'avoir un programme qui leur restitue un paysage en "vue perspective" à partir d'un nombre plus ou moins important de coordonnées x,y et z. Les variables x et y sont dans ce cas des coordonnées géographiques exprimées en cm, m ou km et la variable z l'altitude correspondante. La figure 16 montre un exemple de vue en perspective obtenue à partir de relevés topographiques et de courbes de niveaux d'un site géographique.

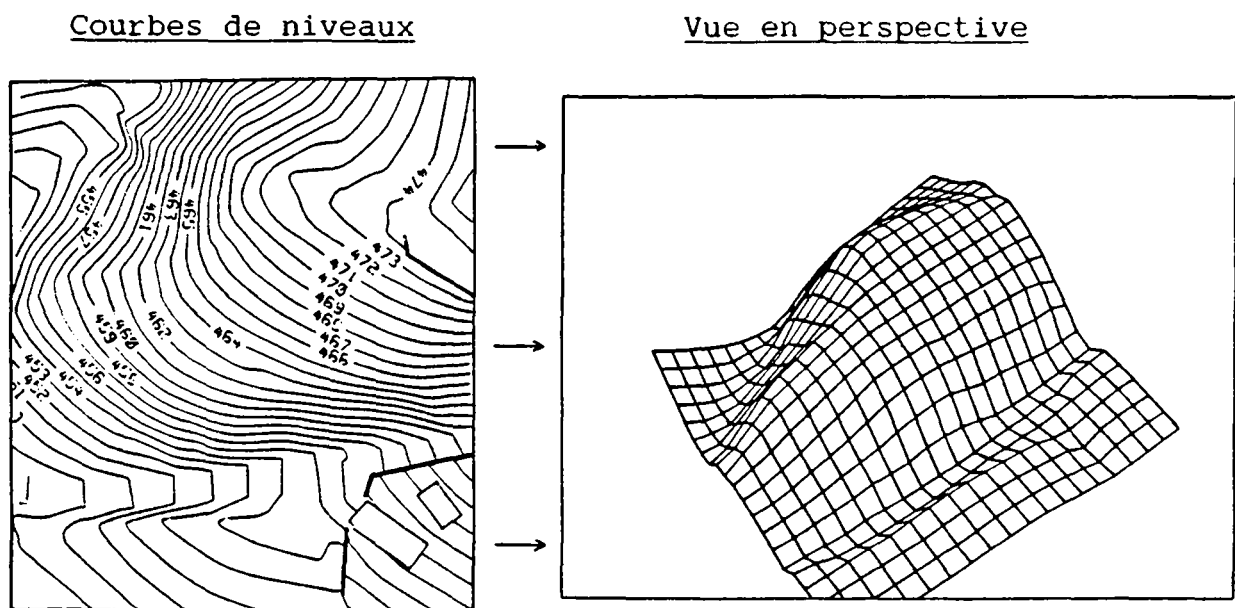


Figure 16: Vue en perspective d'un site géographique obtenu à partir de courbes de niveaux.

Les chimistes peuvent utiliser un tel programme par exemple en spectroscopie de fluorescence. Les coordonnées x et y seront dans ce cas des longueurs d'ondes, exprimées en nm. La variable z sera quant à elle une intensité de fluorescence exprimée en unités arbitraires.

Une brève explication du fonctionnement de ce programme suit à présent.

A partir d'un champ de points x,y,z, dans lequel la distribution des points peut être arbitraire, une grille triangulaire est établie. Chaque triangle obtenu est alors subdivisé en 16 sous-triangles. Le programme crée ensuite des surfaces courbes en utilisant la méthode des éléments finis. L'interpolation des surfaces implique une approximation bicubique complète :

$$Z(X,Y) = a_1 + a_2 X + a_3 Y + a_4 X^2 + a_5 XY + a_6 Y^2 + a_7 X^3 + a_8 X^2 Y + a_9 XY^2 + a_{10} Y^3$$

Pour la réalisation numérique des fonctions de Zienkiewicz sont utilisées [Bazeley et al. 1965],

$$Z(X,Y) = \sum_{i=1}^3 U_i N_i$$

dans lesquelles  $U_i$  sont des paramètres et  $N_i$  les fonctions qui sont écrites en coordonnées triangulaires naturelles.

Ce programme est très facile d'emploi, du moins dans le cas de notre utilisation. Il contient un nombre considérable de menus d'utilisation sous forme interactive. Il est écrit en Fortran 77 et est installé sur un ordinateur VAX. Il nécessite des temps d'utilisation très brefs.

### 3.3. La réalisation pratique des diagrammes de contours et des champs de fluorescence en 3 dimensions.

La réalisation pratique est identique pour les deux types de dessins. Une option dans le programme "CIP" représentera soit le champ de fluorescence total soit le diagramme de contours. Les échantillons traités contiennent des quantités variables de PAH. Afin de pouvoir comparer leur spectre de fluorescence total, les échantillons les plus concentrés ont été dilués au moyen de DMSO pur de façon à obtenir la même intensité de fluorescence maximale pour tous les échantillons. Les champs de fluorescence totale présentés aux figures 17 à 20 ne sont donc pas stoechiométriques. Ces figures sont destinées uniquement à une description qualitative de la répartition des intensités de fluorescence. Nous essayerons d'en déduire un certain nombre d'informations sur la variation des proportions de différents groupes de PAH dans des échantillons corrélatifs de l'environnement.

Comment avons nous procédé pratiquement ? Un volume de 4 ml de chaque échantillon traité est placé dans un tube en quartz destiné aux balayages de fluorescence. Les tubes sont placés dans un détecteur de fluorescence Perkin-Elmer LS-5. On enregistre de chaque échantillon 41 spectres d'émission en partant d'une longueur d'onde d'excitation fixée à 230 nm et en les espaçant de 5 nm. Le dernier spectre est donc enregistré à 430 nm d'excitation.

Le domaine des longueurs d'ondes des spectres d'émission s'étale à chaque fois entre  $X+20$  et  $X+270$  nm,  $X$  étant la longueur d'onde d'excitation fixe. Le domaine de longueurs d'ondes balayé forme donc un losange comme indiqué par les lettres A-B-C-D des diagrammes de contours 17b à 20b. Pour chaque spectre d'émission les intensités de fluorescence les plus importantes ont été enregistrées dans la mémoire de l'ordinateur avec les coordonnées d'excitation et d'émission correspondantes. Pour chaque échantillon traité par cette méthode il a fallu introduire entre 350 (standard de pyrène) et 850 (échantillon d'eau de pluie) coordonnées  $X, Y$  et  $Z$  afin d'être sûr qu'une représentation suffisamment précise de la fluorescence totale soit restituée.

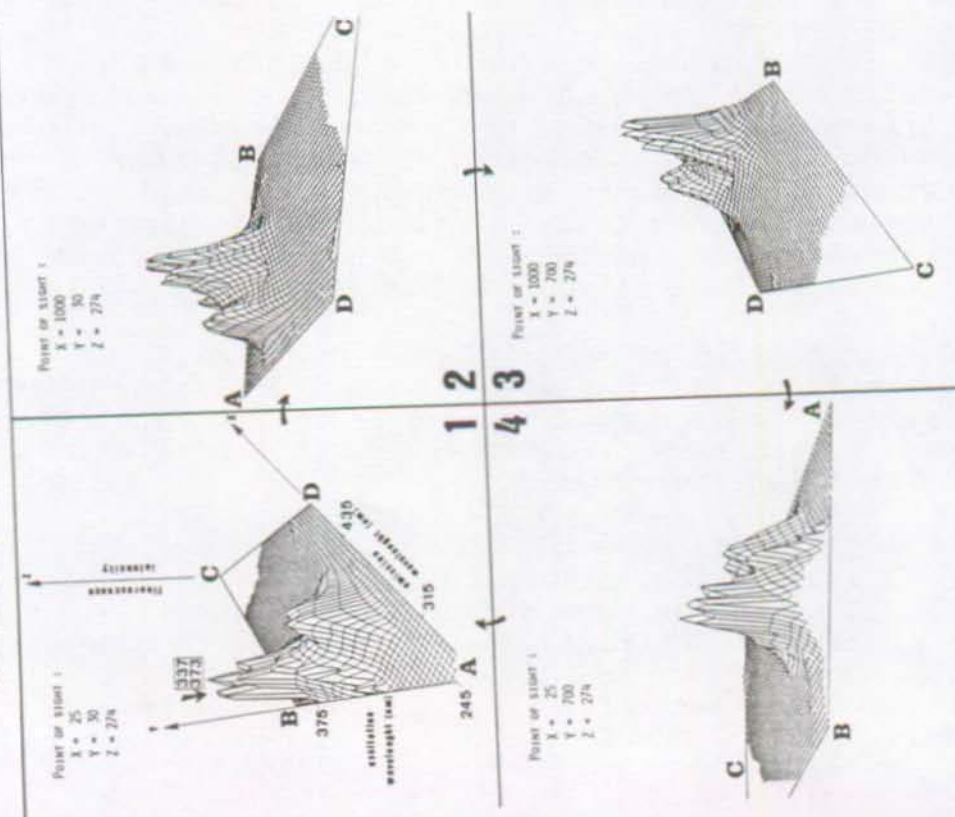
Il est intéressant de noter qu'environ les 2/3 du domaine de fluorescence obtenu se situe dans le visible ( $\lambda > 400$  nm) pour 1/3 seulement dans l'ultra-violet.

### 3.4. Les échantillons traités par le programme "CIP".

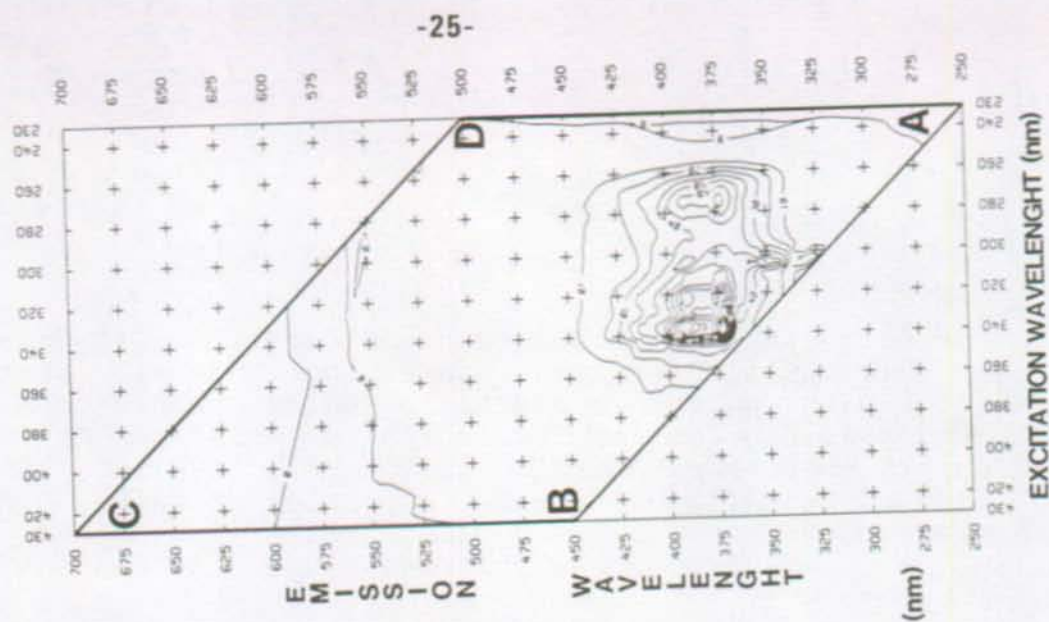
La procédure utilisée pour obtenir les diagrammes en 3 dimensions a un inconvénient important : elle est très lente, pour la simple raison que nous ne disposons pas de connection directe entre la sortie du détecteur de fluorescence et l'entrée de l'ordinateur. Il a donc fallu sélectionner le plus judicieusement possible les échantillons traités par cette méthode. Au total 7 échantillons ont été étudiés :

Standard de pyrène pur (Figures 17a et 17b): Il s'agit d'une solution contenant 29 ng/g de pyrène dans du DMSO. La figure 17a montre des maxima de fluorescence bien séparés. Il en sera toujours de même pour les molécules ayant une disposition des niveaux vibratoires relativement simple. Le diagramme de contour 17b montre 6 maxima de fluorescence respectivement aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission suivantes : 275-373, 275-392, 322-373, 322-392, 333-373 et 333-392. Parmi ces 6 maxima c'est celui situé aux coordonnées 333-373 qui est le plus intense. C'est ce couple de longueurs d'ondes-là qui sera sélectionné pour identifier le pyrène dans un mélange complexe au moyen d'une procédure associant l'HPLC à une détection par fluorescence. Connaissant le temps de rétention du pyrène, on calera les longueurs d'ondes du détecteur de fluorescence au couple optimal pour la détection de ce produit, juste avant sa sortie de la colonne analytique. Juste après le passage du pyrène on changera le couple de longueurs d'ondes pour la substance fluorescente suivante, ce qui à chaque fois nous permettra de détecter sélectivement une substance fluorescente bien précise. La figure 72 (fiche analytique No 10, annexe No 2) nous montre un exemple de chromatogramme en phase liquide où différents couples de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission ont été sélectionnés afin de détecter sélectivement les 15 PAH d'un standard. On remarquera cependant que des longueurs d'ondes dites "de compromis" ont dû être sélectionnées pour certains PAH. Pour le groupe des PAH à 5 cycles (Benzo(a)Anthracène à Benzo(g,h,i)Pérylène) la raison est que ces produits sortent trop rapidement les uns après les autres de la colonne analytique, ce qui fait qu'un changement de longueurs d'ondes suffisamment précis ne peut être effectué.

**Figure 17a**  
**Un hydrocarbure polycyclique**  
**aromatique pur : le pyrène.**  
**Reproduction en perspective**  
**du champ de fluorescence total.**



**Figure 17b**  
**Diagramme**  
**de contours**  
**du champ de**  
**fluorescence**  
**total**  
**du pyrène**



La haute sélectivité et sensibilité du détecteur de fluorescence vient du fait qu'il est très rare que deux substances fluorescentes aient un couple excitation-émission identique.

Le tableau 5 présente les couples excitation-émission conseillés par différents chercheurs pour identifier sélectivement les PAH étudiés dans ce travail. Une chose frappe tout de suite dans ce tableau: les couples conseillés ne sont jamais les mêmes d'une recherche à une autre. Deux raisons majeures peuvent être invoquées :

La première est que plusieurs maxima de fluorescence peuvent être choisis pour un même PAH, comme illustré précédemment par le pyrène.

La seconde est que le solvant dans lequel sont dissous les PAH exerce une influence considérable sur la position des maxima de fluorescence. En général un déplacement vers les grandes longueurs d'ondes est observé si la constante diélectrique du solvant augmente [Rhys Williams 1980].

Mélange de 15 PAH purs (Figure 18a et 18b): Un mélange de 15 PAH fût effectué dans du DMSO avec les concentrations voisines suivantes exprimées en ng/g: Nph (19,9); Ace (15,8); F (12,9); Phe (14,1); An (15,3); Ft (12,9); Pyr (13,5); B(a)A (25,8); Chy (26,4); B(e)P (24,1); B(b)F (25,2); B(k)F (24,6); B(a)P (27,0); DBA (26,4); BP(28,8). Ces 15 PAH forment la base des standards utilisés tout au long de ce travail. Le champ de fluorescence (Figure 18a) montre la présence d'un très important maximum de fluorescence, situé à 297 nm d'excitation et 406 nm d'émission sur le diagramme de contour (Figure 18b). Il est utile de souligner la présence de ce maximum de fluorescence car il est formé à peu de choses près par le même couple de longueurs d'ondes (295-410) sélectionné pour l'analyse de tous les PAH à 5 cycles de ce travail et ceci pour la raison invoquée dans le paragraphe précédent. Ce couple de longueurs d'ondes forme précisément le maximum d'une région à haute sensibilité de fluorescence du mélange de nos 15 PAH.

Les échantillons de sol et de tissus de lombriciens: 4 échantillons corrélatifs de l'environnement furent prélevés à la Station Fédérale de Recherche en Chimie Agricole et sur l'Hygiène de l'Environnement de Liebefeld. Il s'agit respectivement des échantillons suivants :

- Sol de référence.
- Tissus de lombriciens du sol de référence.
- Sol amendé en boue d'épuration (Figures 19 a et b).
- Tissus de lombriciens du sol amendé en boue d'épuration.

Les vers de terre furent prélevés par la technique d'épandage de formol dilué [Raw 1959].

Tableau 5 : Couples de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission recommandés par différents chercheurs pour la détection des PAH analysés dans ce travail.

PAH	COUPLE EX-EM	Ref.	PAH	COUPLE EX-EM	Ref.
Nph	250 - 340	1	B(e)P	305 - 395	1
Ace	275 - 340	1		325 - 412	4
F	260 - 310	1		329 - 389	6
Phe	295 - 360	1	B(b)F	300 - 500	1
	250 - 370	2		340 - 425	4
An	305 - 405	1		305 - 500	5
	254 - 400	3		301 - 424	6
Ft	305 - 480	1	B(k)F	295 - 410	1
	280 - 470	2		300 - 432	4
	350 - 445	4		279 - 405	5
	365 - 500	5		305 - 402	6
Pyr	295 - 390	1	B(a)P	305 - 410	1
	268 - 410	2		390 - 403	2
	295 - 400	3		295 - 408	3
	325 - 398	4		355 - 410	4
	338 - 394	5		365 - 405	5
	332 - 392	6		381 - 402	6
	333 - 373	7	DBA	300 - 400	1
B(a)A	295 - 410	1		263 - 400	3
	290 - 410	2		290 - 420	4
	280 - 410	4		299 - 392	6
	290 - 410	5	BP	305 - 420	1
Chy	295 - 385	1		375 - 425	4
	268 - 410	2		297 - 405	5
	263 - 400	3		382 - 419	6
	308 - 405	4			
	268 - 410	5			

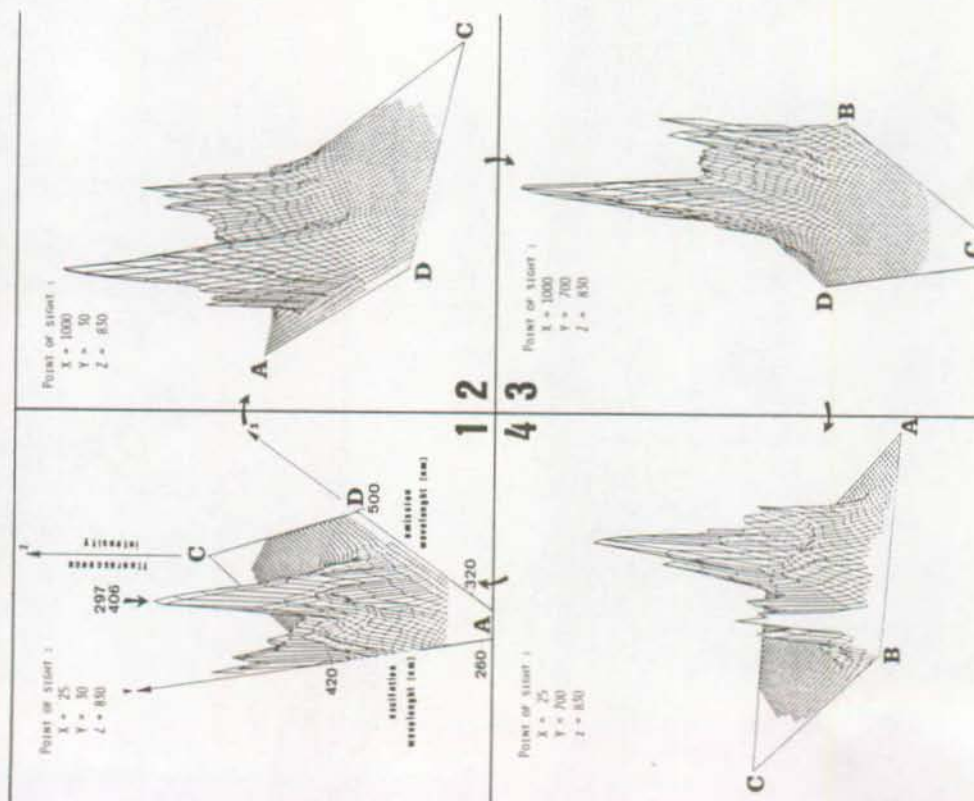
Références et solvants utilisés

- |                       |      |                      |
|-----------------------|------|----------------------|
| 1. Ogan et al.        | 1979 | acétonitrile         |
| 2. Colin et al        | 1980 | n-alkane             |
| 3. Wandruszka et al.  | 1979 | solution aqueuse     |
| 4. Tomingas et al.    | 1977 | --                   |
| 5. Colin et al.       | 1981 | mélange eau-méthanol |
| 6. Katz et al.        | 1978 | toluène              |
| 7. Le présent travail |      | DMSO                 |



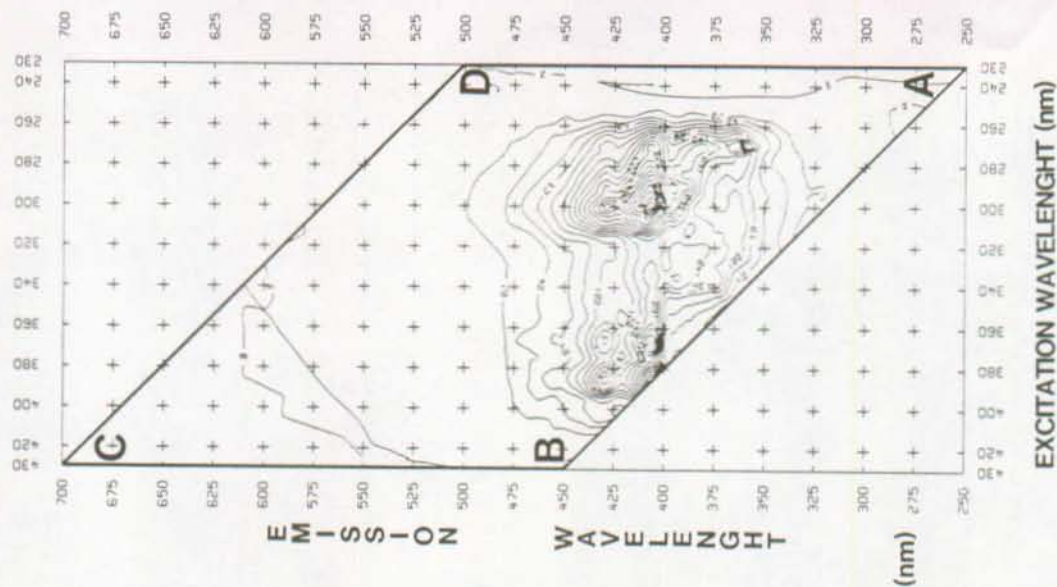
**Figure 18a**

**Mélange de 15 hydrocarbures polycycliques aromatiques. Reproduction en perspective du champ de fluorescence total.**



**Figure 18b**

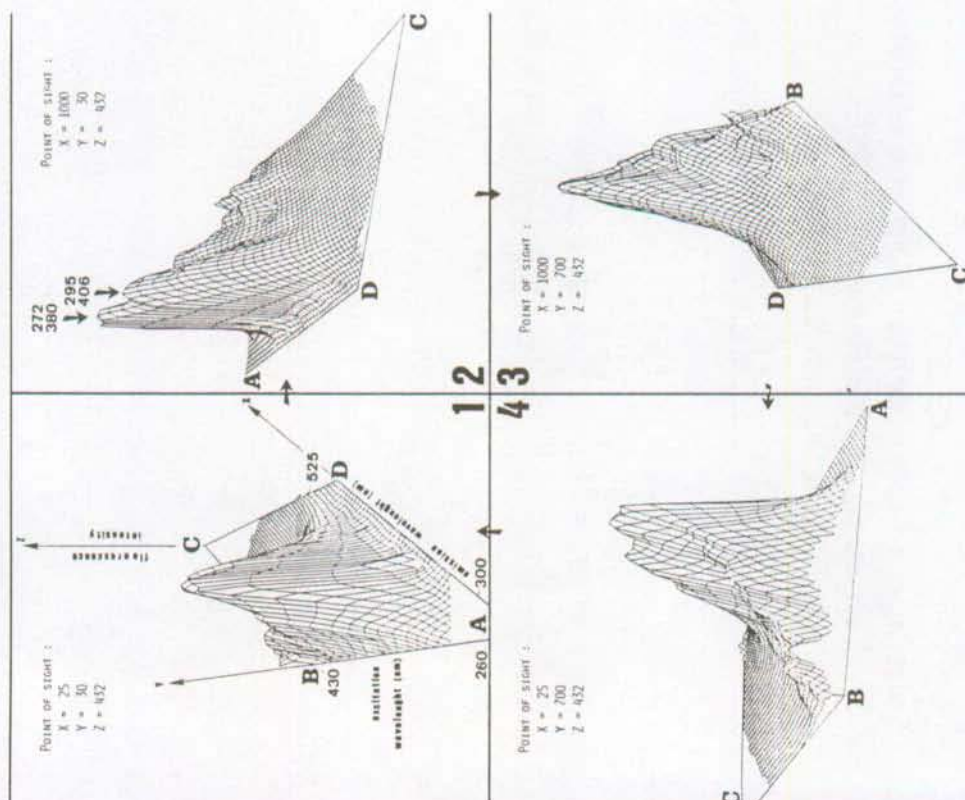
**Diagramme de contours du champ de fluorescence total d'un mélange de 15 PAH**





**Figure 19a**

**Substances fluorescentes du sol amendé  
en boue d'épuration (Liebefeld - CH).  
Reproduction en perspective  
du champ de fluorescence total.**



**Figure 19b**

**Sol amendé**

**en boue**

**d'épuration**

**(Liebefeld - CH).**

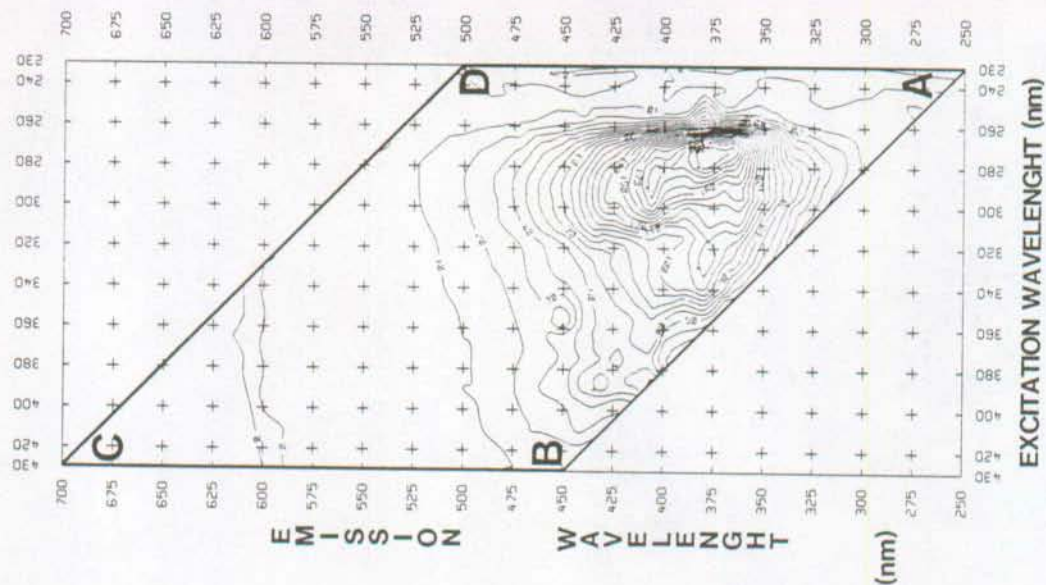
**Diagramme**

**de contours**

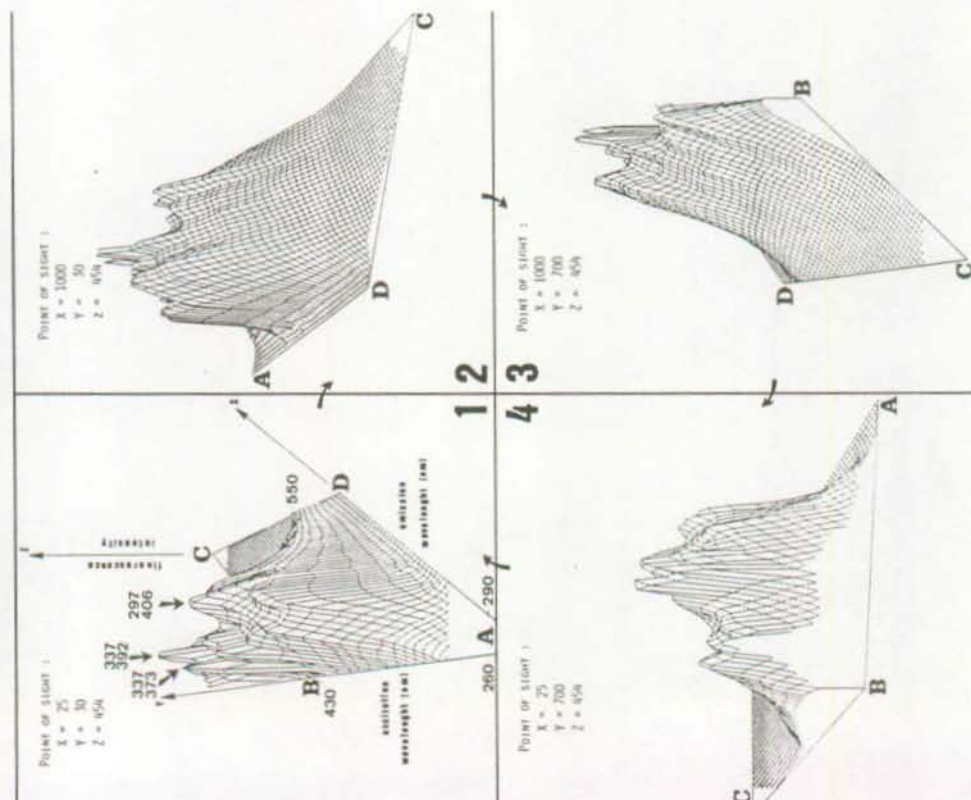
**du champ de**

**fluorescence**

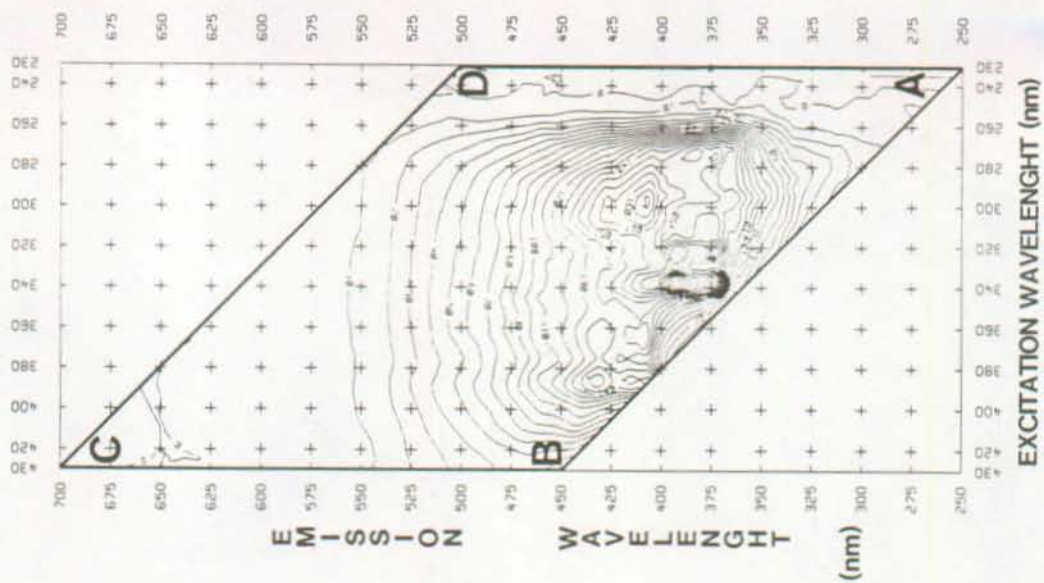
**totale.**



**Figure 20a**  
**Substances fluorescentes d'un échantillon**  
**d'eau de pluie (Ependes - CH).**  
**Reproduction en perspective**  
**du champ de fluorescence total.**



**Figure 20b**  
**Echantillon**  
**d'eau de pluie**  
**(Ependes - CH).**  
**Diagramme**  
**de contours**  
**du champ de**  
**fluorescence**  
**totale.**



Des champs de fluorescence totaux et des diagrammes de contours furent obtenus de ces échantillons. Un exemple de ces deux représentations est illustré pour l'échantillon de sol amendé en boue d'épuration (figures 19a et 19b).

L'interprétation des figures obtenues les unes par rapport aux autres sera effectuée dans le chapitre 5, consacré à l'étude de la pénétration des PAH dans les tissus des lombriciens.

Remarquons déjà que les maxima de fluorescence sont bien moins précis et beaucoup plus arrondis dans ces 4 échantillons que dans les échantillons contenant des standards de PAH. Ceci est dû au fait que des quantités d'autres substances fluorescentes sont présentes dans les échantillons de l'environnement comme en témoigne la figure 67b du chapitre 5.

Echantillon d'eau de pluie (Figure 20a et 20b): Le dernier échantillon traité est un extrait purifié d'hydrocarbures polycycliques aromatiques provenant d'un échantillon d'eau de pluie. Cet échantillon fût prélevé le 15 mai 1984 à Ependes (canton de Fribourg). On remarque déjà que l'allure générale de ce diagramme est très différente de celles obtenues pour les 4 échantillons de l'écosystème terrestre.

Si nous comparons les diagrammes de contours du pyrène pur (Figure 17b) et de l'eau de pluie (Figure 20b) nous observons que les maxima du pyrène sont distinctement visibles dans cet échantillon. Le pyrène est après le fluoranthène et le phénanthrène de loin le PAH le plus abondant de cet échantillon.

#### 4. CRITIQUE DE LA METHODE PROPOSEE.

La méthode proposée pour obtenir les diagrammes de fluorescence totale comporte un certain nombre d'avantages et d'inconvénients que nous rassemblons ici.

Parmi les avantages nous noterons que cette méthode ne nécessite pas l'achat d'un équipement spécialement créé pour la réalisation de spectres de fluorescence totale.

Le raccord entre la sortie du détecteur et l'entrée de l'ordinateur est aisément réalisable. Il permettrait l'utilisation du système proposé en routine. Il serait souhaitable dans l'avenir de développer davantage des liaisons automatiques entre appareils émetteurs de données et appareils d'exploitation de données.

La qualité des spectres obtenus est excellente et meilleure que dans certains autres systèmes proposés.

L'intérêt de prendre un programme dans le domaine de la cartographie ajoute le concept de "rotation" qui n'existe pas souvent dans les programmes purement chimiques.

Parmi les inconvénients de la méthode nous noterons que le balayage d'émission n'est pas simultané pour toutes les longueurs d'ondes d'excitation comme c'est le cas pour les détecteurs équipés de diodes en série. En conséquence une légère dégradation des substances fluorescentes peut se produire durant les balayages successifs.

Une approche quantitative est difficile avec ce programme, mais pas impossible : une extension du programme prévoit des calculs de volumes.

---



## **CHAPITRE 3**

# **Etude des voies de pénétration de quelques micropolluants organiques dans les sols agricoles.**

*Ce chapitre mettra en évidence l'importance des précipitations atmosphériques dans la contamination des écosystèmes par les polychlorobiphényles (PCB) et les hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH). Pour ces derniers en particulier, la proximité d'une grande ville, telle que Berne, est d'une très grande importance pour la contamination de base des sols agricoles. Importance telle, qu'elle peut masquer les effets de la seconde voie d'entrée importante des polluants organiques dans les sols : l'épandage des boues des stations d'épuration.*

*En pleine campagne l'apport de micropolluants organiques par les boues se remarque surtout dans les concentrations en PAH et PCB de faible poids moléculaire du sol, alors que les précipitations atmosphériques influencent surtout celles de poids moléculaire lourd.*

*Les engrais de ferme représentent aussi une source d'entrée de PAH et de PCB dans les sols mais en moindre mesure que les précipitations et l'épandage de boues. Les engrais minéraux et les agents de traitement des cultures ne représentent une source de contamination des sols que dans quelques rares cas accidentels. La fin du chapitre est consacrée à une pondération des différentes sources précitées.*

### **1) INTRODUCTION**

Les recherches rapportées dans ce chapitre ont été possibles grâce à un mandat du Fonds National de la Recherche Scientifique. Le programme national de recherche 7D prévoyait l'étude des substances organiques nocives dans les boues des stations d'épuration. Le sujet traitant plus particulièrement de la pénétration des substances organiques nocives dans les sols agricoles par l'épandages de boues d'épuration des eaux a été confié à l'Institut de Génie de l'Environnement. Les principaux résultats de cette recherche ont fait l'objet de deux publications [Diercxsens et al. 1987a et b].

Entre la fin des années 50 et le début des années 70 naît progressivement chez beaucoup de scientifiques et de responsables politiques une forte conscience des problèmes de pollution de l'environnement. Les premiers problèmes qui ont été traités étaient ceux reliés à la contamination des eaux au sens large. Une grande quantité de stations d'épuration (STEP) ont été construites avec comme conséquence directe les problèmes d'élimination de leurs boues. Actuellement les deux méthodes d'élimination des boues les plus fréquemment utilisées par les pays de la C.E.E. sont l'épandage sur les sols agricoles et l'enfouissement en mer [Pinto et al., 1983].



Du point de vue écotoxicologique on sait que les boues d'épuration peuvent avoir des activités mutagènes [Jacobs et al. 1983, Clevenger et al. 1983, Dean et al. 1985]. De plus l'épandage fréquent de boues d'épuration a pour effet d'augmenter le pourcentage de matières organiques de la couche superficielle de sol et parallèlement d'y augmenter la rétention de micropolluants organiques [Fairbanks et al. 1984, Demirjian et al. 1987], ces deux facteurs étant étroitement liés.

## 2) LES BUTS DE CETTE PARTIE DE LA RECHERCHE

Ce chapitre abordera principalement les voies de pénétration des hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH) et des polychlorobiphényles (PCB) dans les sols agricoles. Afin de relativiser le comportement de ces deux familles deux autres polluants organiques seront étudiés : il s'agit du di-éthyl-hexyl-phtalate (DEHP) et du 4-nonylphénol (4-NP). Ce dernier n'est pas un polluant prioritaire mais un polluant dont l'accumulation dans les boues d'épuration est inquiétante. Nous parlerons d'avantage de cette substance dans la revue bibliographique qui lui est consacrée (paragraphe 3).

Le DEHP est le seul phtalate que nous avons rencontré en grande concentration dans les boues d'épuration. En quelques mots, il s'agit d'un produit utilisé comme plastifiant dans le chlorure de polyvinyl. En 1979 les Etats-Unis en produisaient 2 kg par personne. On retrouve cette substance dans tous les écosystèmes. C'est moins sa toxicité aigue qui fait peur que ses effets à long terme, elle serait une substance cancérigène potentielle [Peakall 1975, Giam et al. 1984].

Du point de vue bibliographique nous avons constaté que de nombreuses recherches ont été faites au sujet de deux sources importantes de contamination des sols par les micropolluants organiques :

- les boues d'épuration : nous réactualiserons notre synthèse bibliographique que nous avons publiée en 1983 sur ce sujet (Annexe 3).
- les précipitations atmosphériques : les points les plus importants des différentes recherches seront synthétisés.

Du point de vue des recherches appliquées nous nous sommes fixés 5 objectifs :

- Voir quelle est l'état de contamination des boues des stations d'épuration de Suisse par les micropolluants précités et comment fluctue cette contamination dans le temps.
- Observer dans quelle mesure la proximité d'une grande ville influence la teneur en PAH et en PCB d'un sol agricole par rapport aux teneurs enregistrées dans des sols situés en pleine campagne.
- Voir de quelle manière les teneurs en micropolluants organiques d'un sol peuvent être influencées par un épandage de boue d'épuration et comment ces teneurs évoluent dans le temps.

- Comparer la contamination des sols causée par les boues à celle provoquée par d'autres voies d'entrée de micropolluants organiques telles que l'épandage de fertilisants minéraux ou animaux et les précipitations atmosphériques.
- Voir de quelle manière les concentrations des micropolluants évoluent avec la profondeur du sol.

### 3) LES RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

#### 3.1 Les boues d'épuration

Tout au début de la recherche consacrée à la présence des micropolluants organiques dans les boues d'épuration des eaux nous avons effectué une synthèse bibliographique sur ce sujet [Tarradellas et al., 1983]. Entre 1983 et aujourd'hui beaucoup d'autres recherches ont été faites sur le même thème, ce qui nous amène à réactualiser le sujet.

Une grande partie des recherches sur les substances organiques des boues d'épuration s'est focalisée les dernières années sur la présence dans les boues de constituants de détergents industriels ou domestiques et de leurs produits de dégradation. Deux familles de substances tensioactives ont été étudiées : les agents de surface non ioniques [Giger et al. 1984 et 1987a] et anioniques [Mc Evoy et al. 1985, Giger et al. 1987a, De Henau et al. 1986]. En ce qui concerne les agents de surface non ioniques ce ne sont pas les produits de base, tel que le 4-alkylphénol-polyéthoxylate, qui posent des problèmes, mais bien leurs produits de dégradation biologique tel que l'octyl-, le décyl- et surtout le nonylphénol. (Figure 21).

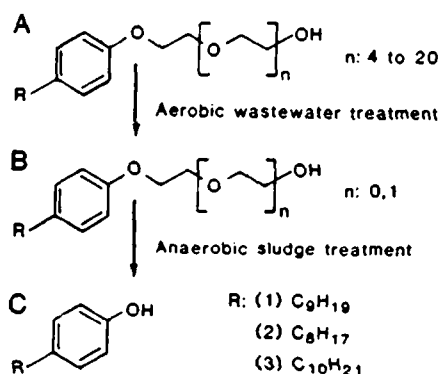


Figure 21: Les produits de dégradation biologique des alkylphénol-polyéthoxylates (A) durant le traitement aérobie des eaux usées et anaérobie des boues. Les métabolites résistants sont les alkylphénol-mono- et diéthoxylates (B) et les alkylphénols (C). Nonyl (1), octyl (2) et décyl (3) forment les substituants alkyl (R) [Giger et al. 1984]

Le nonylphénol s'accumule à des taux moyens de 1g/kg P.S. dans les boues d'épuration digérées anaérobies. Or dans le milieu aquatique la  $\text{LC}_{50}$  de ces substances pour les poissons est comprise entre 0,13 et 0,3 mg/l. Pour d'autres substances de toxicité comparable (le cadmium par exemple) les doses maximales admises dans les boues sont habituellement établies aux alentours de 30 mg/kg P.S.. Il était donc urgent d'étudier la dégradabilité de ces substances [Brüschweiler et al. 1983] et de limiter l'usage d'agents de surface non ioniques.

Les techniques analytiques concernant cette catégorie de substances organiques ont dès lors fait de grands progrès, d'abord au moyen de la chromatographie en phase gazeuse avec colonne capillaire en verre [Stephanou & Giger 1982], puis au moyen de la chromatographie en phase liquide [Ahel & Giger 1985a, 1985b, Holt et al. 1986]. Cet appareillage équipé d'une colonne "phase réverse", produit une analyse plus rapide que la GC mais ne sépare pas les différents nonylphénols-polyéthoxylates en fonction du nombre de groupements éthoxy.

Si la toxicité des nonylphénols est prouvée et généralement acceptée par tout le monde, y compris les fabricants de détergents, il n'en est pas de même pour les alkylbenzènes-sulfonates linéaires ou LAS (Figure 22).

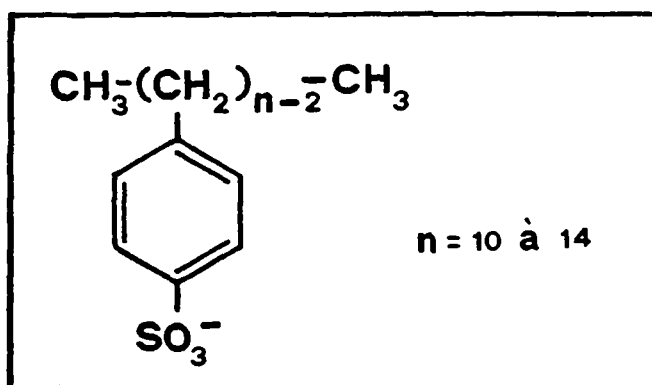


Figure 22: Formule plane des alkylbenzènes sulfonates linéaires ou LAS.

Vers le milieu des années 70 les LAS ont déjà remplacé les alkylbenzènes-sulfonates ramifiés ou ABS qui étaient peu biodégradables et étaient les principaux responsables des problèmes posés par la présence de détergents dans les eaux. Les LAS sont des agents de surface anioniques sur lesquels il n'y a pas unanimité du point de vue de leur comportement dans les boues d'épuration. Il règne un conflit d'idées sur la rapidité de dégradation des LAS d'une part et leur dégradation complète d'autre part. En d'autres mots, si une substance ayant une concentration initiale importante subit une dégradation rapide (de l'ordre de 90% en quelques jours) dans les boues d'épuration, les 10% restants représenteront encore une teneur non négligeable de cette substance pouvant entraîner des phénomènes de toxicité. Tel est le cas pour les LAS dont des concentrations importantes sont détectées dans les boues d'épuration [Mc Evoy & Giger 1985].

L'inquiétude règne aussi sur la dégradabilité de certains composés organométalliques et de leur accumulation possible dans les boues des STEP. Les principaux composés entrant dans cette catégorie sont les organo-étains qui ont des applications industrielles très importantes comme catalyseurs et comme



biocides [Donard et al. 1986]. Les teneurs en ces composés dans les boues de la STEP d'Altenrhein se situent aux alentours de 1,5 mg/kg P.S. [Zingg 1985].

Avec l'amélioration constante des techniques analytiques des dernières années, un effort a finalement été fait pour mettre au point des procédures analytiques permettant l'analyse simultanée d'un maximum de substances organiques dans les boues d'épuration [Feiler et al. 1980, Naylor et al. 1982 a et b, Jacobs et al. 1983, Anna et al. 1984, Fricke et al. 1985]. De ces études il ressort que les polluants organiques les plus abondants dans les boues sont le butyl-benzyl-phthalate, le diéthyl-phthalate, le bis(2-éthylhexyl)phthalate, le 2,4,6-trichlorophénol et le pentachlorophénol.

### 3.2. Les précipitations atmosphériques

Les références bibliographiques qui traitent de la répartition des polluants organiques sur toute la biosphère par le biais des courants météorologiques et des précipitations ne manquent pas. Nous essayerons dans le présent paragraphe de faire un tour d'horizon des recherches effectuées dans ce domaine.

La diffusion de substances organiques par les phénomènes climatologiques est un phénomène bien connu qui fut rapporté pour la première fois au sujet des pesticides par Risebrough et al. (1968) et Seba et al. (1971). Le cycle de l'eau qui consiste en une évaporation, un transport de la vapeur et une condensation sous forme de pluie, de neige ou d'autres formes a toujours véhiculé des substances organiques d'origine naturelle depuis que la terre existe. Ces substances sont principalement des n-alkanes ( $C_{17}$  à  $C_{35}$ ) et des acides gras ( $C_{12}$  à  $C_{30}$ ) [Kawamura et al. 1985]. Actuellement ce sont ces substances organiques qu'on trouve surtout dans les précipitations de territoires naturels non industriels tels que le nord de la Norvège [Lunde et al. 1977].

La nature des substances organiques et leur concentrations dans les précipitations varient fortement lorsqu'on se déplace d'un

environnement naturel vers une zone industrialisée. On y découvre alors des PAH, des phénols, des acides benzoïques, de l'anthraquinone et du xanthone [Pankow et al. 1984, Leuenberger et al. 1985, Lunde et al. 1977]. Parmi ces substances qui reflètent typiquement les activités industrielles ce sont les phénols qui tiennent le haut du pavé en termes de concentrations [Leuenberger et al. 1985].

#### Que dit la littérature scientifique en particulier de la présence de PAH dans les précipitations ?

Les sources principales de PAH dans l'atmosphère sont les activités industrielles, le chauffage des usines et des habitations, les gaz d'échappement des véhicules à moteur et les émanations d'origine naturelle telles que celles des volcans ou

des feux de forêts [Quaghebeur et al. 1983, Nikolaou et al. 1984].

Pas moins de 120 PAH différents, adsorbés sur des particules atmosphériques ou solubilisés, ont été détectés par GCMS [Grimmer et al. 1972, Lee et al. 1976]. Parmi tous ces PAH ce sont le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène les plus abondants [Kawamura et al. 1983].

Les teneurs en PAH dans les pluies varient fortement en fonction des saisons. On observe toujours une forte augmentation des concentrations en hiver [Gordon et al. 1976, Georgii et al. 1983, Quaghebeur et al. 1983, Giger et al. 1987b]. Il y aurait 3 raisons liées à cette augmentation :

- le chauffage domestique augmente fortement en hiver,
- les PAH de l'atmosphère se dégradent plus facilement en été par réaction avec des radicaux .OH, avec l'ozone ainsi qu'avec les radicaux oxydants du smog photochimique,
- le benzo(a)pyrène et le pérylène sont photolysés par les rayons ultraviolets solaires qui sont plus intenses en été.

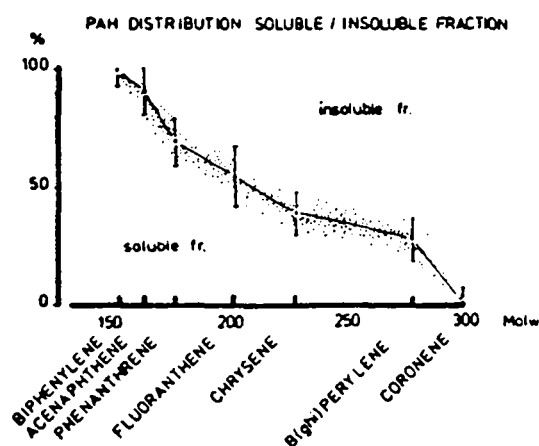


Figure 23: Repartition des PAH en fractions solubles et insolubles dans les précipitations atmosphériques en fonction de leur poids moléculaire [Georgii et al. 1983].

Giger et al. 1987b observent que les concentrations des PAH augmentent dans l'ordre suivant : pluie d'été < pluie d'hiver ≡ neige << brouillard. Dans les échantillons de pluie et de neige les PAH à 3 et 4 noyaux prédominent, tandis que dans le brouillard les PAH à 5 et 6 cycles aromatiques constituent les composants principaux.

Les PAH retombent de deux façons différentes sur le sol, les eaux superficielles ou les mers : soit sous forme solubilisée (c'est le cas de la majorité des PAH de faible poids moléculaire), soit

adsorbés sur des particules en suspension (c'est le cas de la plupart des PAH à poids moléculaire plus élevé) [Yamasaki et al. 1982]. Georgii et al. (1983), ont représenté cette distribution des PAH en fraction soluble et insoluble dans les précipitations en fonction du poids moléculaire de ces substances (Figure 23). Finalement il a été observé que les grosses quantités de PAH étaient amenées sur les sols en tout début des pluies par entraînement des particules de l'atmosphère [Noort 1985].

#### Que dit la littérature scientifique en particulier pour la présence des PCB dans les précipitations ?

L'introduction de ce travail signale les multiples usages des PCB. Une fois à l'état de déchets, les PCB peuvent à la longue se volatiliser et se répartir sur la totalité de la biosphère par les courants atmosphériques [Brooksbank 1983]. C'est ce processus météorologique-là qui est responsable du fait qu'on trouve des contaminations de fond en PCB dans les endroits les plus retirés de la planète tel que l'antarctique [Subramanian et al. 1983]. Contrairement aux PAH la quantité de PCB transportée par des particules serait assez faible (0,6 à 20%). Plus de 50% des PCB seraient transportés sous forme de vapeur et environ 30% seraient solubilisés [Eisenreich et al. 1981].

Les teneurs en PCB totaux habituellement rencontrées dans les pluies oscillent entre 20 et 230 ng/l [Swain 1978, Strachan et al. 1980, De Alencastro & Tarradellas 1985].

Il s'écoule en moyenne 2 à 3 années entre le moment où on produit des PCB et celui où on les retrouve dans les lichens [Villeneuve et al. 1984]. Les précipitations atmosphériques doivent être considérées comme la voie de pénétration principale des PCB dans les lacs [Strachan et al. 1979].

#### 4) LA CONTAMINATION DES BOUES D'EPURATION.

##### 4.1 Etude des boues de 6 stations d'épuration de Suisse.

Nous essayerons de voir dans ce paragraphe quelle est l'état de contamination des boues des stations d'épuration de Suisse par les 4 familles de micropolluants citées dans le paragraphe 2.

Nous avons sélectionné 6 stations d'épuration en tenant compte des trois critères suivants:

- Les STEP devaient avoir une répartition aussi large que possible sur le territoire national.
- Les STEP devaient couvrir une gamme assez large d'équivalents-habitants hydrauliques.
- Les STEP devaient collecter les eaux usées de zones urbaines et de zones agricoles.

Les 6 stations d'épuration sélectionnées sont classées par ordre croissant du nombre d'équivalents-habitants : Wädenswil (26.700), Morges (28.650), Fribourg (55.000), Altenrhein (60.000), Coire (69.500) et Bienne (107.400) [OFPE 1983].

Il faut signaler cependant que nous n'avons pas pu bénéficier d'une liberté totale en ce qui concerne la sélection des stations de Wädenswil, d'Altenrhein et de Coire, devant tenir compte des autres partenaires du PNR 7D. Si les deux dernières de ces STEP constituent un bon choix, la STEP de Wädenswil représente à notre avis une erreur de sélection car c'est la seule qui ne disposait pas encore de boues digérées anaérobie au moment des prélèvements, or ce sont uniquement des boues de ce type qui sont épandues sur les sols agricoles.

La situation géographique des 6 STEP sélectionnées se trouve indiquée sur la carte suivante (Figure 24).

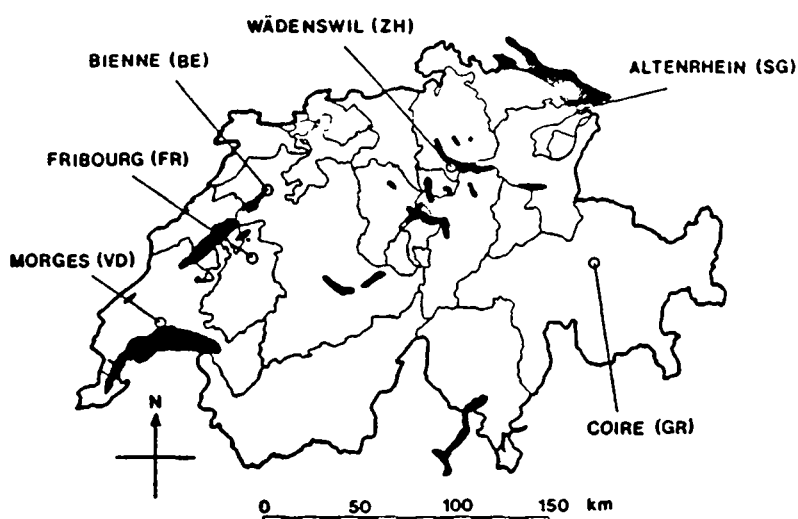


Figure 24: Situation géographique des 6 STEP sélectionnées en vue de l'analyse de leur boues digérées anaérobie.

Les 4 familles de micropolluants ont été analysées selon le plan du tableau 6 dans les boues des 6 stations d'épuration.

Tableau 6 : Plan d'analyse des boues des 6 STEP.

Micropolluants organiques	Nombre d'analyses	Dates
PAH et PCB	4	04/06/1984
		30/01/1985
		19/08/1985
		03/02/1985
PE et 4-NP	1	30/01/1985

Il ne nous a pas paru intéressant de détailler tous les résultats obtenus pour chaque station d'épuration. En effet, les teneurs en micropolluants organiques sont assez semblables dans les 6 STEP,

à l'exception de la STEP de Bienne où les boues présentent en moyenne des teneurs 2 à 3 fois plus importantes que celles des 5 autres STEP.

La comparaison avec les moyennes mondiales est éloquent et est illustrée sur la Figure 25. Elle montre une contamination assez importante pour le 4-NP, modérée à faible pour les PCB et PAH et très faible pour les phthalates. cette contamination assez élevée des boues en 4-NP se comprend aisément par le fait que la majorité des autres analyses en 4-NP a également été effectuée en Suisse. Les moyennes mondiales ont été établies d'après les chiffres trouvés dans 8 références [Grimmer et al. 1978 et 1980, Hotar et al. 1979, Hagenmaier et al. 1979 et 1986, Mc Intyre et al. 1981, Anna et al. 1984 et Fricke et al. 1985].

Les teneurs en quelques congénères spécifiques de PCB ont aussi été déterminées dans les boues des 6 stations. La correspondance des numéros IUPAC peut être trouvée à la fiche analytique No 8 :

PCB No 28 :	9 ± 4	138 :	130 ± 121	
52 :	92 ± 91	153 :	119 ± 103	(µg/kg P.S.)
101 :	75 ± 68	180 :	56 ± 51	

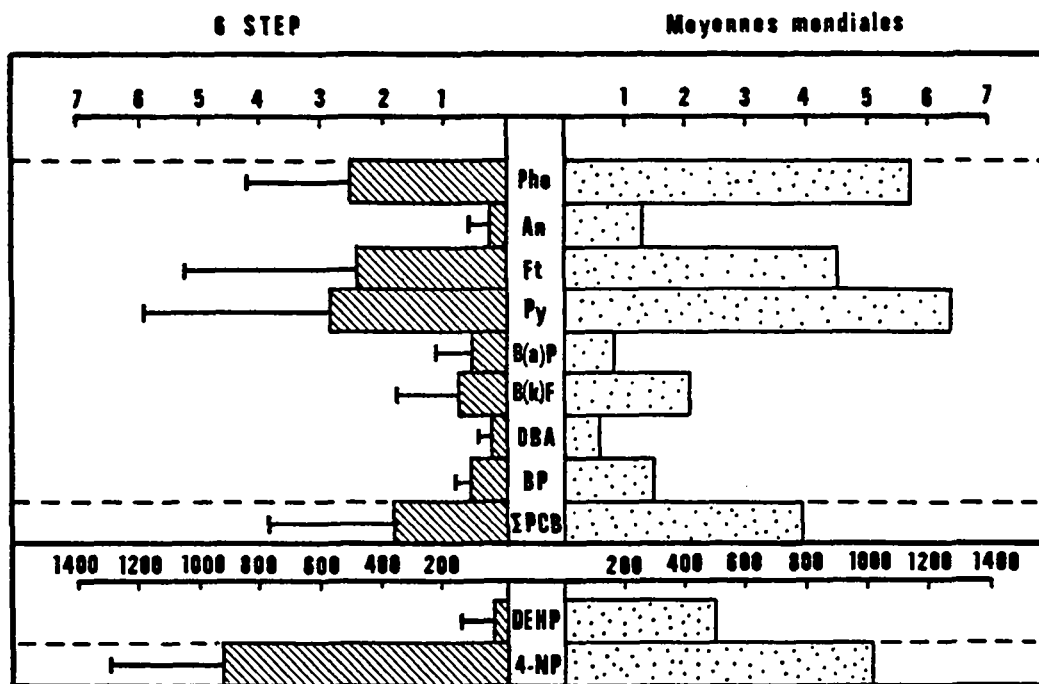


Figure 25: Comparaison des concentrations de quelques micropolluants organiques dans les boues des 6 STEP étudiées par rapport aux moyennes mondiales (mg/kg P.S.)

Les dates du tableau 6 montrent que deux campagnes de prélèvements ont été effectuées en été et deux en hiver pour les PAH et les PCB. Des concentrations en PAH et PCB significativement plus élevées ont été détectées dans les boues d'hiver ( $\alpha=0,05$ ). Cette constatation est tantôt confirmée [Suess 1980], tantôt infirmée [Grimmer et al. 1980] par les publications. Nous optons plutôt pour une confirmation assez générale de ce phénomène au regard de notre revue bibliographique du paragraphe 3.2.

Parmi les PAH détectés, le fluoranthène et le pyrène sont à chaque fois les composés les plus abondants. Cette constatation se vérifie dans n'importe quel échantillon de l'environnement que nous avons eu à analyser durant cette recherche, qu'il s'agisse d'eaux de pluies, de boues d'épuration, de lisiers animaux ou de sols. La littérature confirme cette constatation. [Hites et al. 1975, Mille et al. 1982, Kawamura et al. 1983]. Pour les PCB, les congénères les plus abondants dans les boues sont les No 52, 95, 101, 138, 170 et 180 (Numéros IUPAC). Les sites de substitution correspondants à chacun de ces numéros peuvent être retrouvés dans le tableau 30 de la fiche analytique 8 située en annexe de ce travail.

#### 4.2. Les fluctuations des concentrations en micropolluants organiques dans les boues d'épuration au cours du temps.

La question est de savoir si un agriculteur risque d'un jour à l'autre de contaminer son champ avec une boue d'épuration plus contaminée en micropolluants organiques que celle qu'il aurait prélevée la veille.

Afin de connaître la variabilité de la contamination des boues d'épuration en micropolluants organiques, une analyse journalière de PCB et de benzo(a)pyrène a été effectuée durant 30 jours ouvrables à la STEP de Fribourg entre le 15/10/84 et le 23/11/84. La concentration de ces deux micropolluants organiques est comparée à celle de deux métaux lourds analysés par les responsables de la station d'épuration durant la même période. La figure 26 montre qu'aussi bien pour les PCB que pour le benzo(a)pyrène la concentration peut fluctuer du simple au double, voir au triple en deux jours de temps. Il n'y a cependant pas eu de saut logarithmique de la concentration durant cette période.

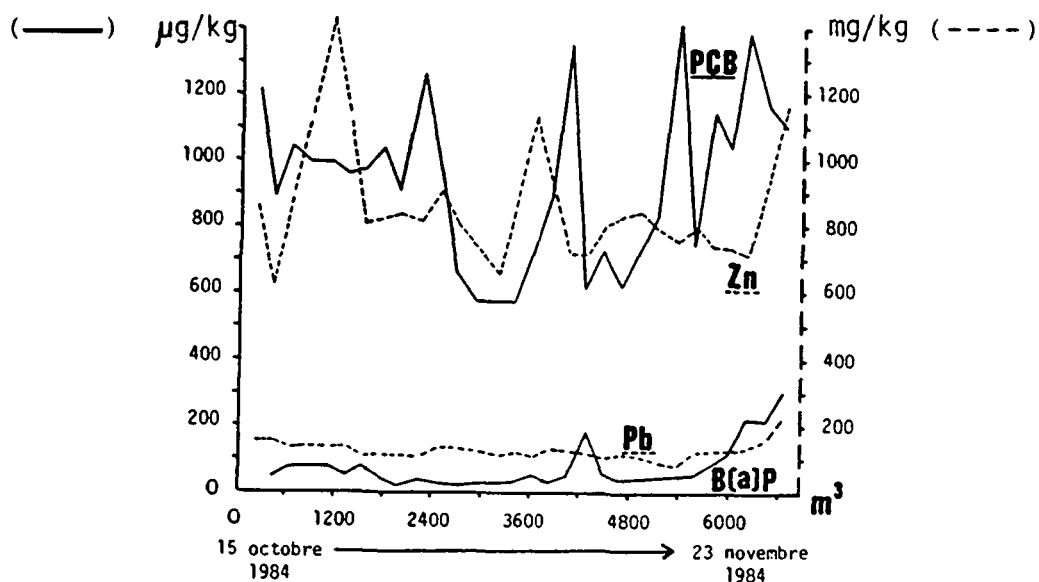


Figure 26: Fluctuation de concentration en PCB et B(a)P de la boue d'épuration de la STEP de Fribourg durant 30 jours ouvrables (µg/Kg P.S.). Comparaison avec celle de deux métaux lourds, Plomb et Zinc (mg/kg P.S.).

Une analyse isolée d'une boue d'épuration donne, dans l'ordre de grandeur, un reflet assez fidèle de la contamination qu'elle aura durant le mois qui suit. A notre avis une analyse mensuelle en PCB et PAH d'une boue met l'agriculteur à l'abri d'une mauvaise surprise.

5) INFLUENCE DE LA PROXIMITE D'UNE ZONE URBAINE DANS LA CONTAMINATION DES SOLS PAR LES PAH ET LES PCB.

Ce paragraphe a un double objectif :

- Examiner l'influence de la proximité d'une zone urbaine (la ville de Berne dans notre cas) dans la contamination de fond des sols en PAH et PCB.
- Observer l'impact de l'épandage de boues d'épuration sur la contamination de fond de sols cultivés situés en zone agricole d'une part et en zone urbaine d'autre part.

Afin d'atteindre ces objectifs, 7 sites ont été sélectionnés selon la clef de répartition du tableau 7 :

Tableau 7 : Clef de répartition des 7 sites sélectionnés.

	Sols cultivés situés en zone urbaine							Sols cultivés situés en zone agricole	
SITUATION	0 à 5 km du centre de la ville							10 à 15 km du centre de la ville	
Numéros des sols non amendés en boue	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <span>1</span><span>2</span><span>3</span><span>4</span><span>5</span> </div>							6	7
Numéros des sols amendés en boue	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <span>1a 1b 1c</span><span>2a</span><span>3a</span><span>4a</span><span>5a</span> </div>							6a	7a
Nombre d'analyses de chaque polluant	1	1	1	1	1	1	1	5	5

La sélection de ces 7 sites a représenté une des difficultés majeures de ce travail de recherche. Les critères de sélection reposent essentiellement sur 4 points, à savoir :

1. Disposer d'une gamme étendue d'épandage (0,5 à 10 T. M.S./ha).
2. Trouver des sols amendés en boues et des sols témoins géographiquement très proches les uns des autres.
3. Disposer de sols amendés aussi bien en zone purement agricole qu'à proximité d'une grande ville.
4. Trouver des agriculteurs collaborateurs à notre travail de recherche.

Le quatrième point, qui est de loin le moins scientifique a cependant joué un rôle prépondérant dans le choix des sites. En effet, il était demandé aux agriculteurs des sites provisoirement sélectionnés, d'établir une fiche descriptive de leur champs. Il fallait que les agriculteurs puissent affirmer avec certitude qu'aucune boue d'épuration n'ait été épandue sur les sites de référence choisis. Les coordonnées des sites sélectionnés se trouvent rassemblés dans le tableau 8.

TABLEAU 8 : Coordonnées des 7 sites sélectionnés.

Site No	Lieu	Coordonnée geogr.	E.M	E.F	B.E	Boues
Site 1	Bern	602 075/197 900	oui	non	non	Neubrück
Site 1a	Bern	602 450/197 500	oui	oui	3,5	Neubrück
Site 1b	Bern	602 350/197 975	non	oui	3,5	Neubrück
Site 1c	Bern	601 900/198 000	oui	oui	>15	Neubrück
Site 2	Oberbottingen	595 400/199 350	oui	oui	non	Neubrück
Site 2a	Oberbottingen	595 525/199 400	oui	oui	>15	Neubrück
Site 3	Worb	609 075/197 500	oui	oui	non	Worbental
Site 3a	Worb	608 575/198 200	oui	oui	8	Worbental
Site 4	Kirchlindach	598 475/206 450	oui	oui	non	Worbental
Site 4a	Kirchlindach	598 450/206 325	oui	non	5	Worbental
Site 5	Gümlingen	605 800/198 100	oui	oui	non	Worbental
Site 5a	Gümlingen	606 350/198 025	oui	non	3	Worbental
Site 6	Ependes	577 900/177 600	oui	oui	non	Fribourg
Site 6a	Ependes	577 000/178 025	oui	non	0,8	Fribourg
Site 7	Montherod	516 900/150 200	oui	oui	non	Morges
Site 7a	Montherod	517 400/149 900	oui	oui	0,8	Morges

E.M. : Le sol a-t-il reçu des engrais minéraux ?

E.F. : Le sol a-t-il reçu des engrais de ferme ?

B.E. : Le sol a-t-il reçu des boues d'épuration (T. M.S./ha)?

Boue : Indique le nom de la STEP d'où proviennent les boues.

Les analyses de PAH et de PCB sont synthétisées dans les figures 27 et 28 et engendrent les commentaires suivants : On constate une grande différence de contamination en PAH des sols situés à proximité d'une grande ville (sites 1 à 5) par rapport à ceux situés en pleine campagne, à plus de 10 km d'une ville d'importance (sites 6 et 7). Cette différence est statistiquement hautement significative ( $\alpha=0,01$ ). Comme nous l'avons vu dans la revue bibliographique, tout processus d'incinération, tel que le chauffage des habitations et l'activité industrielle, constitue une source importante de PAH [Schmitt 1982, Georgii et al. 1983, Quaghebeur et al. 1984]. Son impact sur la contamination des sols agricoles en PAH semble être important. Constatant ce fait on remarque que l'impact des boues d'épuration sur les teneurs en PAH des sols sera plus rapidement perçu en milieu purement agricole qu'en milieu urbain ou semi-urbain.

Ce n'est qu'en épandant 15 tonnes de matière sèche à l'hectare de boue d'épuration que les teneurs en PAH des sols agricoles situés à proximité d'une grande ville sont augmentées. En dessous de 15 T. M.S./ha c'est tantôt le sol amendé en boues qui est le plus contaminé (site 1a, 1b), tantôt le sol de référence (site 3a, 4a, 5a).



FIGURE 27

COMPARAISON DES TENEURS EN  $\Sigma$ PAH DE SOLS AGRICOLES AMENDES EN BOUES D'EPURATION AVEC UN SOL TEMOIN ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

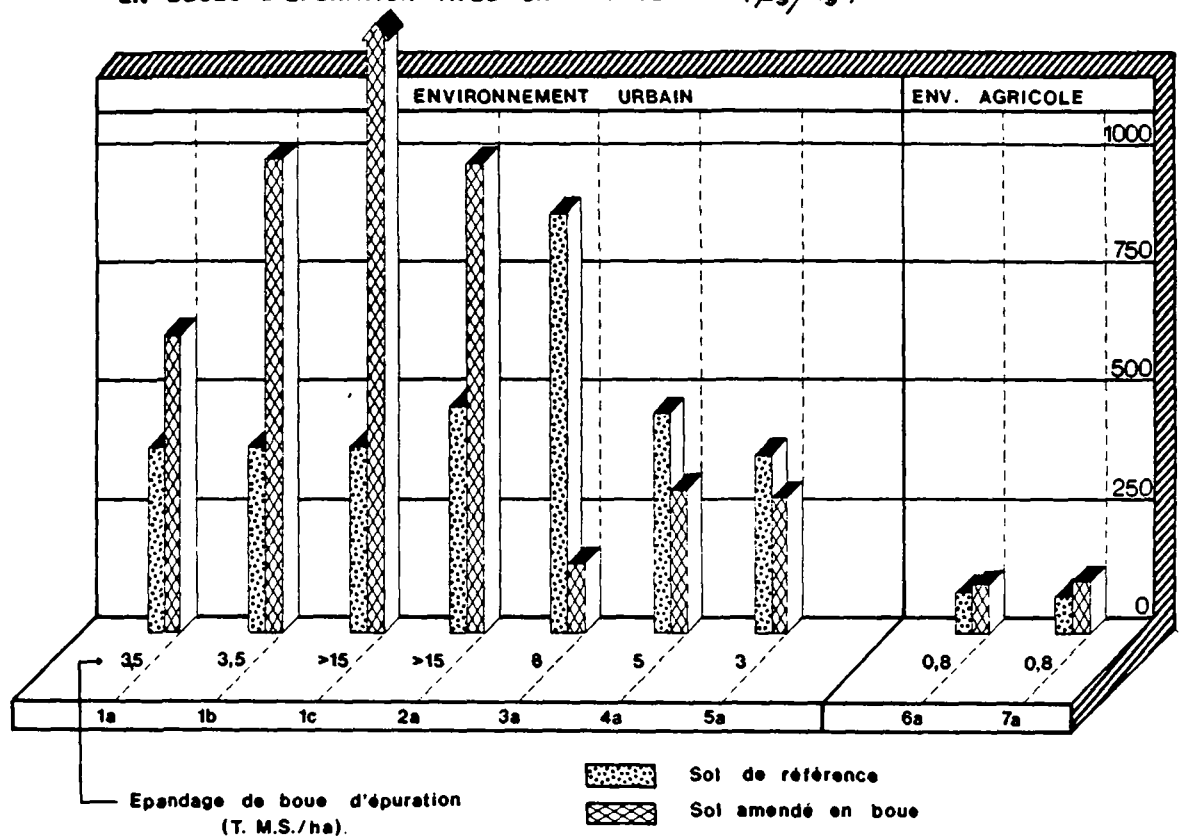
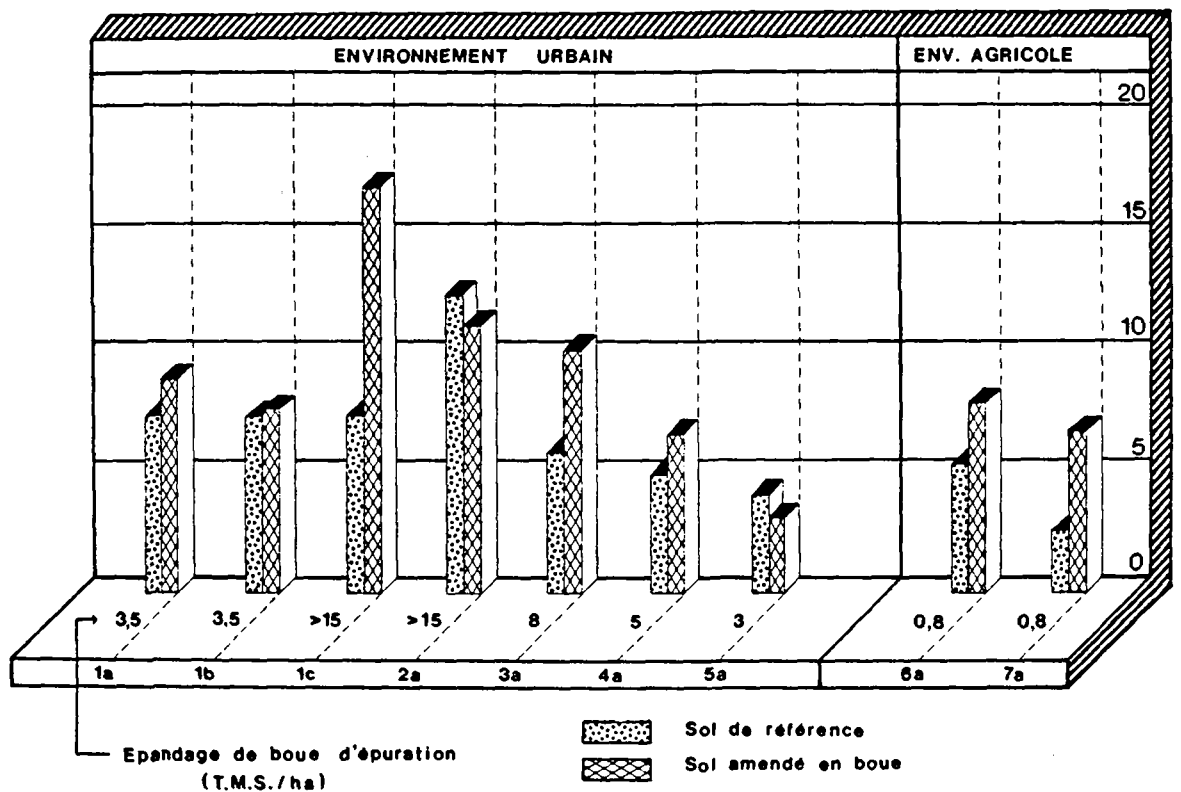


FIGURE 28

COMPARAISON DES TENEURS EN  $\Sigma$ PCB DE SOLS AGRICOLES AMENDES EN BOUES D'EPURATION AVEC UN SOL TEMOIN ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )



En ce qui concerne la contamination en PCB des sites étudiés (Figure 28), il n'existe, même à un faible seuil de probabilité ( $\alpha=0,2$ ), statistiquement aucune différence entre la contamination des sols de référence en milieu urbain et ceux se trouvant en milieu agricole. Nous savons cependant par la revue bibliographique (§3.2) que des précipitations atmosphériques peuvent influencer les teneurs en PCB d'un sol. Il semble donc que les sources de PCB soient bien plus diffuses que celles des PAH, qui elles sont très fortement liées aux activités d'une grande ville.

Du point de vue de l'épandage des boues 15 T. M.S./ha ne sont pas décisives quant à l'augmentation des teneurs en PCB des sols étudiés. Tout porte donc à croire que les apports extérieurs de PAH et de PCB (engrais de ferme, précipitations sèches et humides) jouent un rôle important dans la contamination des sols agricoles par ces micropolluants.

Il ne faut cependant jamais perdre de vue que ces 7 sites ont des caractéristiques pédologiques très différentes (le respect des 4 critères de sélection cités en début de chapitre est à ce prix), par conséquent des comparaisons plus détaillées n'ont aucune signification.

#### 6) ETUDE DE LA DYNAMIQUE DES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES SUITE A L'EPANDAGE DE BOUES D'EPURATIONS.

Ce paragraphe expliquera de façon détaillée le comportement des 4 familles de micropolluants organiques citées au début du paragraphe 2, suite à un épandage de boue d'épuration.

Pour cette étude, un des 9 épandages étudiés au paragraphe 5, a été suivi avec plus grande attention. Le site sélectionné devait correspondre à deux critères principaux:

- recevoir un amendement en boue d'épuration correspondant aux pratiques moyennes en vigueur en Suisse (entre 0,5 et 2,5 tonnes de matières sèches à l'hectare et par an).
- le sol devait être aussi peu contaminé que possible avant l'épandage de la boue d'épuration afin de pouvoir observer clairement les fluctuations de concentrations des polluants.

Le site correspondant à ces deux critères est le site d'Ependes (No 6 et 6a, tableau 8). En ce qui concerne les PAH, les concentrations détectées (1 dans le tableau 9) sont considérées par Edwards (1983) comme étant caractéristiques de sols très peu contaminés.

Le but des analyses détaillées effectuées sur des échantillons de sol de ce site est de voir comment les micropolluants apportés par la boue d'épuration évoluent 1 mois et 3 mois après l'épandage de cette boue. Les teneurs globales en micropolluants détectées dans ce sol au cours du temps ont été les suivantes :

Tableau 9 : Concentration globale en micropolluants\* (ng/g M.S.) de la boue d'épuration et du sol amendé en boues (0-1 cm).

MPO.	CB	1	2	3	4
date	13/03/85	11/03/85	13/03/85	16/04/85	14/06/85
$\Sigma$ PCB	$26.10^1$	$6 \pm 0.3$	$8 \pm 2$	$6 \pm 1$	$6 \pm 1$
$\Sigma$ PAH	$13.10^2$	$78 \pm 15$	$93 \pm 18$	$85 \pm 23$	$93 \pm 35$
4-NP	$49.10^3$	ND	$722 \pm 352$	$330 \pm 188$	$57 \pm 26$
DEHP	$17.10^3$	ND	$157 \pm 34$	ND	ND

\* : moyennes et variances de 5 analyses. ND = non détecté.

CB = Concentration des MPO dans la boue d'épuration  
 Concentration des micropolluants organiques dans le sol :  
 1 = juste avant l'épandage de la boue d'épuration.  
 2 = juste après l'épandage de la boue d'épuration.  
 3 = 1 mois après l'épandage de la boue d'épuration.  
 4 = 3 mois après l'épandage de la boue d'épuration.

Ce qui frappe dans ces teneurs en micropolluants, c'est l'aspect persistant des PAH et des PCB, l'aspect semi-persistant du 4-nonylphénol et la non-persistance du diéthyl-hexyl-phthalate dans le sol étudié.

Les analyses détaillées des PAH et des PCB et l'étude statistique des résultats obtenus.

Les figures 29a, 29b et 30a, 30b illustrent respectivement le comportement des PAH et des PCB de poids moléculaire faible et élevé.

Les tests statistiques qui étayeront les commentaires des analyses détaillées sont les suivants :

La comparaison des moyennes de deux petits échantillons indépendants dans le cas où les variances sont égales ou légèrement différentes = test t.

Dans le cas où les variances présentent de grands écarts, un test t modifié est appliqué [Scherrer 1984].

Le but est de comparer les moyennes des 5 analyses effectuées pour chaque polluant, de voir si la boue d'épuration a statistiquement influencé leur concentration dans la couche superficielle du sol, de voir ce que devient chaque polluant 1 mois après l'épandage de la boue et finalement de voir si l'augmentation des micropolluants observée 3 mois après l'épandage est statistiquement significative.

En ce qui concerne la sélection des polluants dont nous allons suivre le comportement dans les sols, nous avons pour les PAH le choix entre 15 substances. Nous en avons sélectionné 8, indiquées sur les figures 29a et 29b, sur la base des critères suivants :

- 4 substances de faible poids moléculaire et 4 de poids moléculaire élevé.
- Abondance dans l'environnement.
- Importance écotoxicologique.
- Facilité d'identification.

Pour les PCB nous avons le choix entre 35 congénères purs. Nous en avons sélectionné 10, indiqués sur les figures 30a et 30b sur la base des mêmes critères que ceux à respecter pour les PAH. Deux critères viennent cependant s'ajouter aux précédents :

- Absence d'épaulement important avec d'autres pics.
- Limites d'intégration des surfaces des pics facilement identifiables.

Le choix des congénères de PCB a été basé sur les travaux publiés par Duinker et al. (1980), De Alencastro et al. (1983), Safe et al. (1985).

a) Comparaison des teneurs en PAH et PCB du sol avant l'épandage de la boue (1) et juste après l'épandage de la boue (2).

En admettant un intervalle de confiance de 95% ( $\alpha=0,05$ ), il apparaît que la concentration des PAH légers (Figure 29a) et des PCB légers (Figure 30a) a augmenté de façon statistiquement significative dans le sol étudié suite à l'épandage de boue d'épuration. Les concentrations des PAH et des PCB lourds ne semblent par contre pas avoir été affectées de façon significative durant cet épandage.

b) Comparaison des teneurs en PAH et PCB du sol avant l'épandage de la boue (1) et 1 mois après l'épandage de la boue (3).

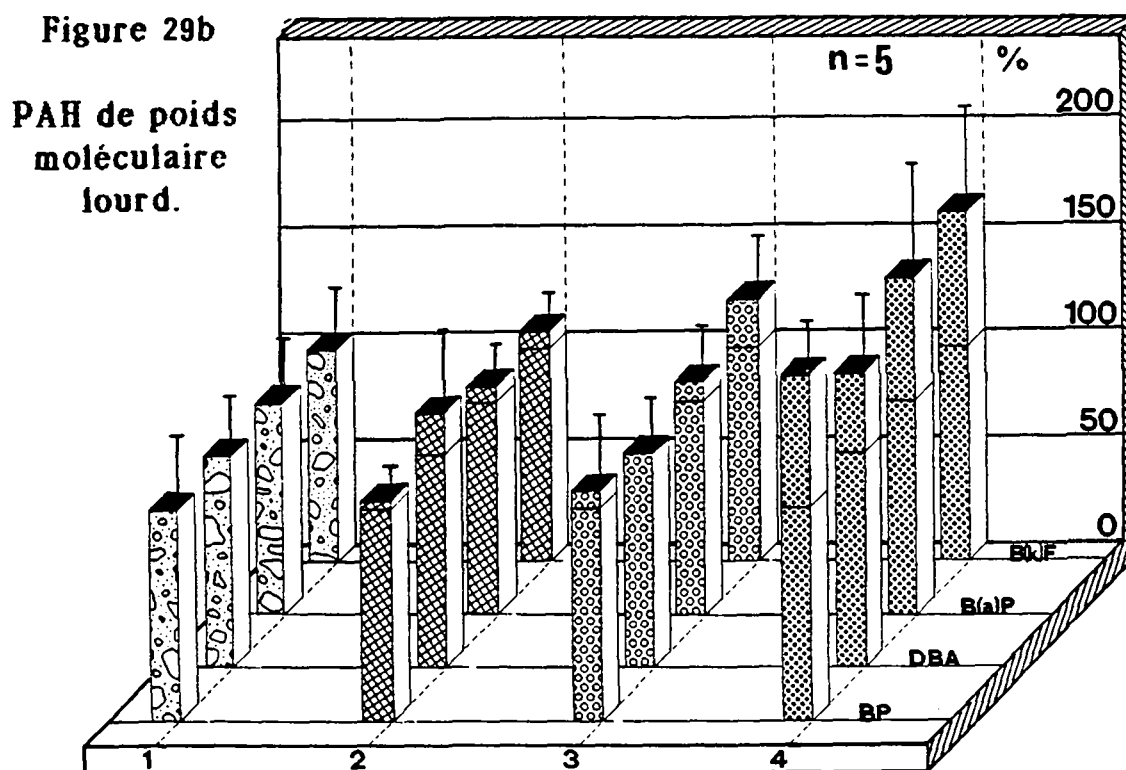
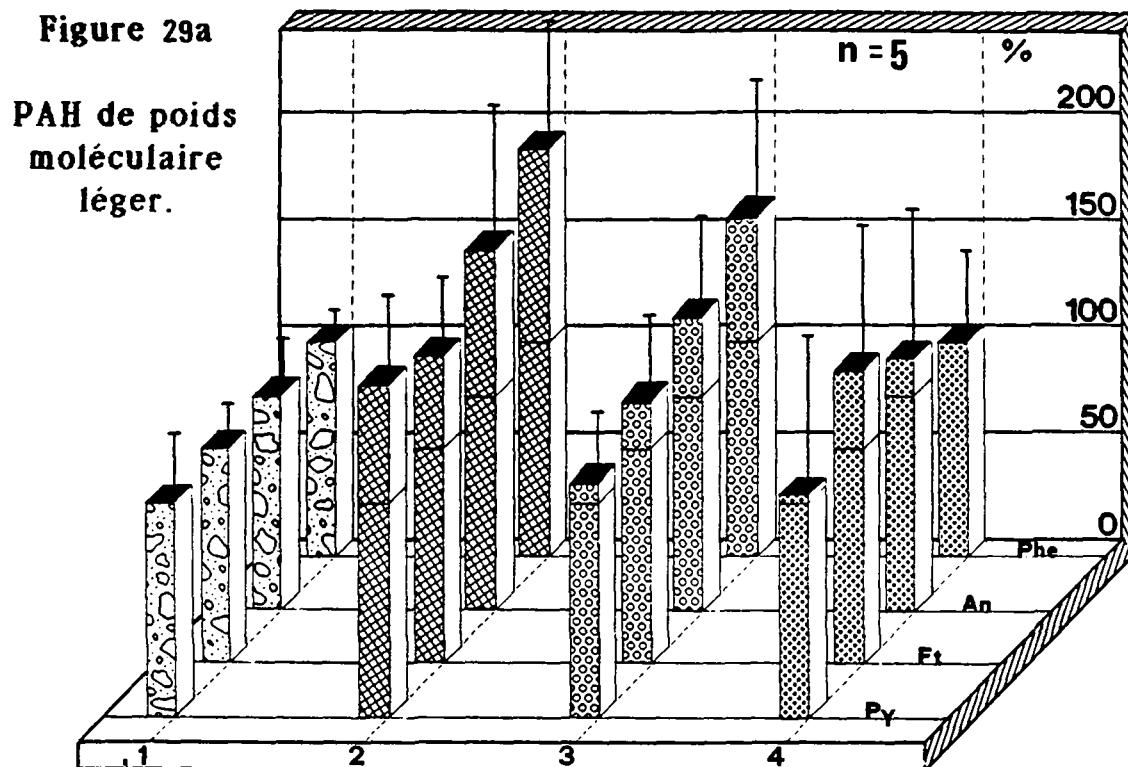
Un (1) mois après l'épandage de la boue plus aucune différence de teneur en PAH et en PCB, qu'ils soient de poids moléculaire lourd ou léger, n'est observée par rapport aux analyses faites juste avant l'épandage de la boue ( $\alpha=0,05$ ). Les PAH et PCB de poids moléculaire léger se sont soit dégradés, soit volatilisés, soit encore ont pénétré en profondeur dans les sols.

c) Comparaison des teneurs en PAH et PCB du sol avant l'épandage de la boue (1) et 3 mois après l'épandage de la boue (4).

Toujours en admettant un intervalle de confiance de 95%, on observe que cette fois ce sont les teneurs en PAH et PCB de poids moléculaire élevé (Figures 29b et 30b) qui sont significativement différentes de celles enregistrées juste avant l'épandage de la boue, alors que les teneurs en PAH et PCB légers du sol ne sont pas modifiées de façon statistiquement significative. L'agriculteur n'a cependant pas touché à ce champ durant toute la période comprise entre l'épandage de la boue (11/03/1985) et les analyses effectuées 3 mois après (14/06/1985). Dans ce cas les précipitations atmosphériques (sèches ou humides) sont la seule source de contamination des sols par les micropolluants.

#### Les analyses d'eau de pluie.

Simultanément aux analyses de sol, un collecteur d'eau de pluie a été placé sur le champ à étudier afin d'avoir des valeurs indicatives de la contamination en PAH et PCB des eaux de pluies. Plusieurs séries d'analyses ont été effectuées, couvrant de manière discontinue la période de recherche sur les sols amendés en boues d'épuration d'Épends (site No 6a). Une décroissance progressive des teneurs en PAH dans les pluies est constatée durant toute la durée de l'expérience (mars à juin 1985). Cette



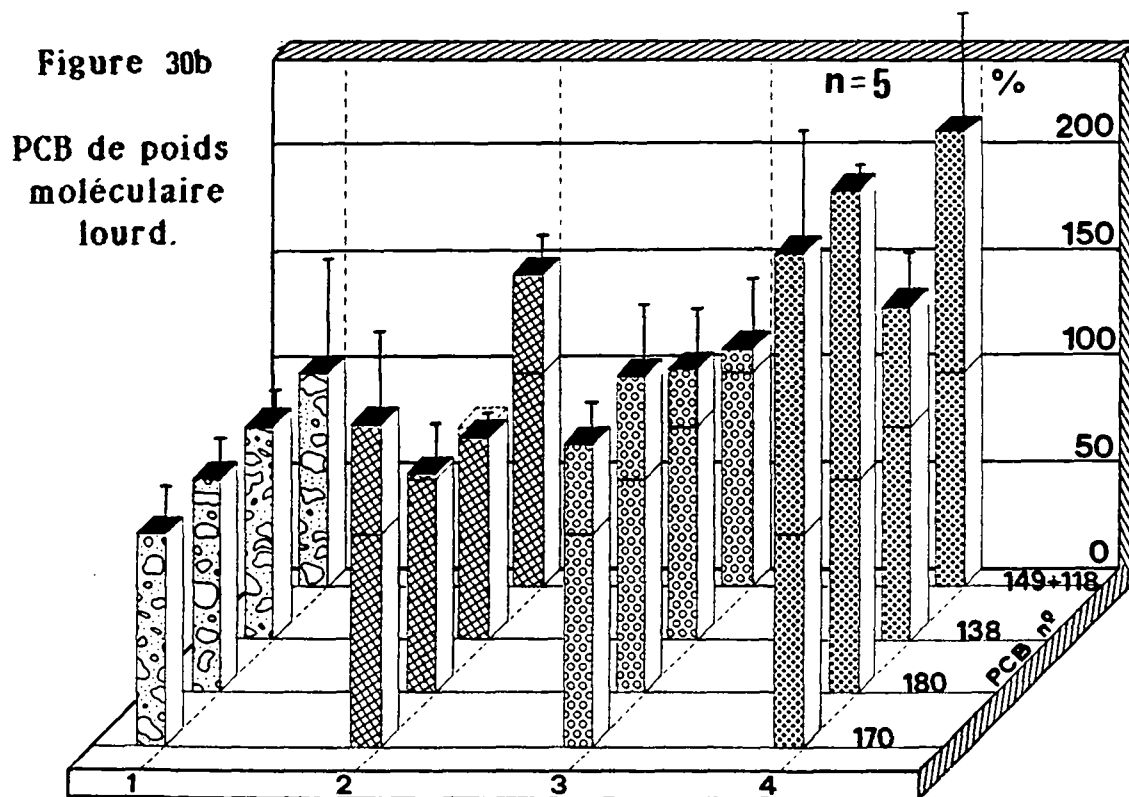
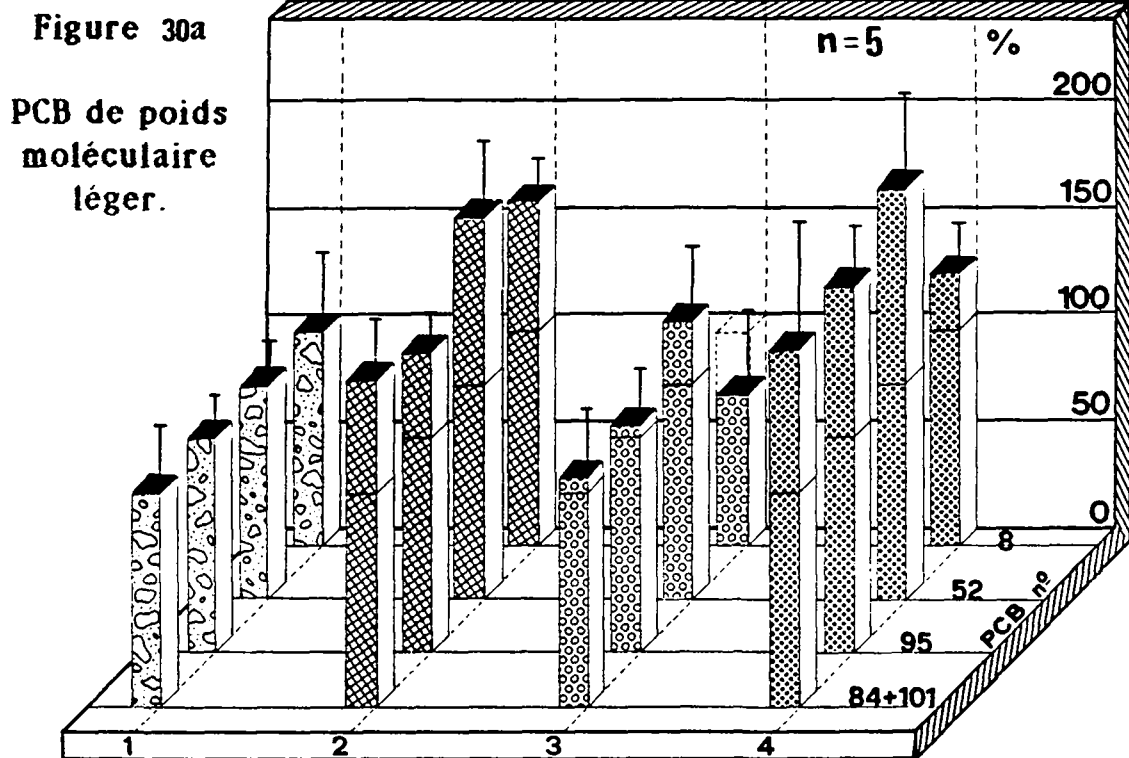
1 = Juste avant l'épandage de la boue (= 100%),

2 = Juste après l'épandage de la boue,

3 = 1 mois après l'épandage de la boue,

4 = 3 mois après l'épandage de la boue.

n = nombre d'analyses effectuées.



- 1 = Juste avant l'épandage de la boue (= 100%),
- 2 = Juste après l'épandage de la boue,
- 3 = 1 mois après l'épandage de la boue,
- 4 = 3 mois après l'épandage de la boue.

n = nombre d'analyses effectuées.

observation, confirmée par d'autres recherches [Quaghebeur et al. 1984], correspond à la diminution importante du chauffage urbain, principale source d'émission de PAH dans l'atmosphère.

Un calcul va nous permettre d'estimer les quantités de PAH de poids moléculaire lourd et léger apportées par la pluie et de les comparer à celles apportées par la boue d'épuration :

- Densité du sol agricole d'Ependes ..... 1,35 g P.S./cm<sup>3</sup>
- Masse de sol sur 1cm de profondeur ..... 13,5 Kg  
(=profondeur de prélèvement) et  
1m<sup>2</sup> de surface.
- Quantité de pluie tombée entre le ..... 417 mm  
13/03 et le 14/06/1985 [I.S.M 1984]. ..... =417 l/m<sup>2</sup>

TABLEAU 10: Comparaison des PAH apportés par les pluies et les boues d'épuration sur le sol agricole d'Ependes.

PAH	Concentration eau de pluie(vg/l)		PAH apportés par la pluie (µg/m <sup>2</sup> )		PAH apportés par la boue (µg/m <sup>2</sup> )
	min.	max.	min.	max.	
Phe	27	283	11,3	118,0	99,5 ± 49,5
An	0,2	3	0,1	1,2	7,4 ± 6,3
Ft	47	297	19,6	123,8	62,1 ± 37,7
Py	43	236	17,9	94,4	126,4 ± 71,8
B(k)F	7	33	2,9	13,7	2,2 ± 2,7
B(a)P	8	39	3,3	16,3	4,4 ± 6,9
DBA	1	5	0,4	2,1	2,2 ± 3,4
BP	9	31	3,7	12,9	3,6 ± 5,4

Ces calculs donnant les résultats du tableau 10 ne sont que des valeurs indicatives et doivent être considérés avec prudence. Toutefois les valeurs comparées des apports de PAH par les pluies et par les boues d'épuration vont dans le sens des analyses statistiques précédentes :

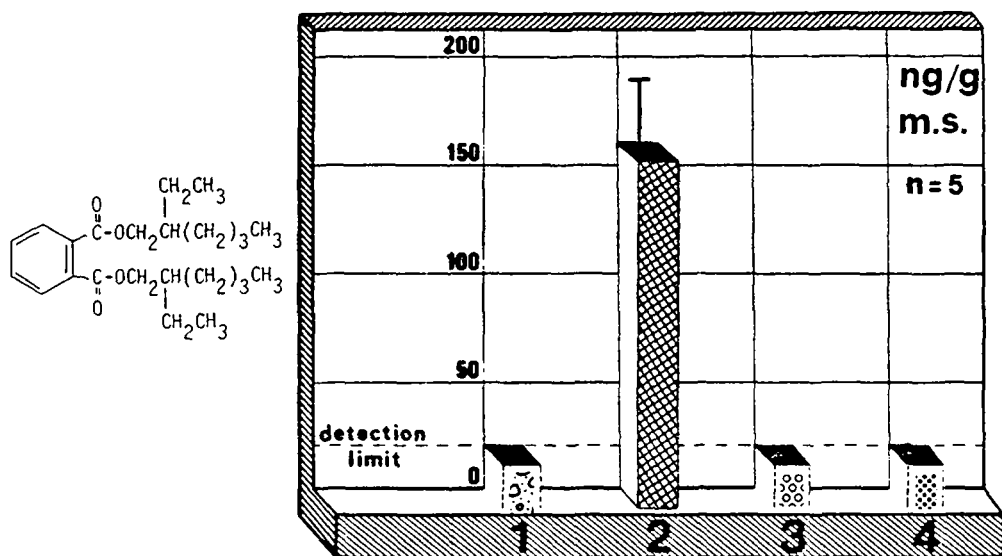
Pendant la période de recherches approfondies sur l'impact d'un épandage de boue d'épuration (0,75 T. M.S./ha), les précipitations atmosphériques ont davantage contribué à l'apport de PAH de poids moléculaire élevé que la boue d'épuration.

Le même calcul ne peut cependant être fait pour les PCB puisque les analyses d'eau de pluie concernant cette famille de MPO se sont avérées négatives. L'augmentation statistiquement significative des PCB de poids moléculaire élevé dans le sol d'Ependes provient vraisemblablement de précipitations sèches (poussières, particules en suspension).

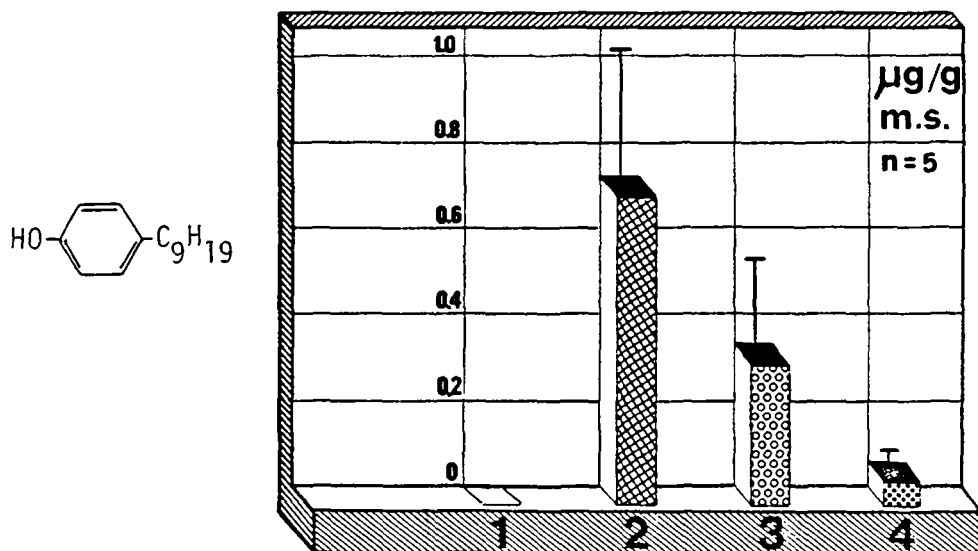
Les analyses détaillées du DEHP et du 4-NP :

Le comportement de ces deux MPO, illustré figures 31 et 32 est comparable. Ils sont détectés à l'état de traces (4-NP) ou ne sont pas détectés (DEHP) dans le sol avant l'épandage de la boue d'épuration. Ils atteignent des teneurs statistiquement plus éle-

**Figure 31: Di - éthyl - hexyl - phthalate**



**Figure 32: 4 - nonylphénol**



1 = Juste avant l'épandage de la boue,  
 2 = Juste après l'épandage de la boue,  
 3 = 1 mois après l'épandage de la boue,  
 4 = 3 mois après l'épandage de la boue.

n = nombre d'analyses effectuées.



vées ( $\alpha=0,05$ ) dans le sol juste après l'épandage; ceci est dû à leurs concentrations importantes dans les boues. Finalement ils disparaissent totalement (DEHP) ou presque ( $\pm 90\%$  pour le 4-NP) 3 mois après l'épandage de la boue d'épuration [Johnson et al. 1975, Saeger et al. 1976].

7) LES EFFETS A LONG TERME DE L'EPANDAGE DE BOUES D'EPURATION :  
COMPARAISON AVEC 2 AUTRES TYPES D'AMENDEMENTS.

Le chapitre 6 a montré que la contamination d'un sol agricole par un épandage unique de boue d'épuration est relativement limitée et est en tous les cas concurrencée par les précipitations atmosphériques. Il est cependant raisonnable de se poser la question suivante : Quelle est l'impact sur la contamination des sols d'un épandage annuel de boues d'épuration durant une assez longue période, 10 ans par exemple. Quelle est l'importance de cette contamination par rapport à d'autres types d'amendements ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons travaillé sur les champs expérimentaux préparés il y a 10 ans par F.X. Stadelmann et O.J. Furrer de la Station Fédérale en Chimie Agricole et sur l'Hygiène de l'Environnement de Liebefeld. Ces champs expérimentaux sont répartis sur deux sites pédologiquement très différents dont la description suit à présent (Figure 33).

SITE DE LIEBEFELD  
Sol brun lessivé

Horizon	Profil	structure	argile	limon	mat. organ.	CaCO <sub>3</sub>	pH H <sub>2</sub> O
cm			%	%	%	%	
Ap 20			16	18	5,0	-	6,0
AB 40			16	19	1,5	-	6,4
B 60			16	16	0,5	-	6,2
Bt 80			18	13	0,5	T	6,2
100							
BC 120			19	13	-	T	6,5
140							
C			14	10	-	2	7,5

Mull

Pierres

Taches d'oxydoréduction

Argillanes

Humus



Racines



Activité lombricienne



Coquillages



Granuleux fin



Polyédrique anguleux

SITE DE BUREN

Sol alluvial calcaire  
faiblement hydromorphe

Horizon	Profil	structure	argile	limon	mat. organ.	CaCO <sub>3</sub>	pH H <sub>2</sub> O
cm			%	%	%	%	
Ap 20			41	50	5,0	24	7,9
B 40			29	67	0,5	30	8,1
60							
80							
Btg 100			33	61	-	21	8,1
120							
140							
BCg			55	43	-	1	7,9

Polyédrique grossier tendant vers prismatique

Très friable

Friable

Ferme

Figure 33 : Description des 2 sites étudiés

Cette description a été effectuée par les chercheurs précités. Chaque année des parcelles de sol de 13 mètres sur 4 sont amendées au moyen d'un des trois types d'amendements suivants:

- a. Fertilisant minéral.
- b. Lisier de porc. ( $\pm$  12 tonnes M.S./ha)
- c. Boue d'épuration. ( $\pm$  12 tonnes M.S./ha)

Les amendements ont duré 10 ans (1976 à 1985). Tous les détails concernant ces champs expérimentaux peuvent être trouvés dans plusieurs publications de la station [Furrer et al. 1982, Stadelmann et al. 1982 et 1984].

Il y a deux grands avantages à travailler sur ces champs expérimentaux:

- Les antécédents de ces champs sont parfaitement connus. Chaque quantité d'amendement apportée au sol est contrôlée, ce qui n'est jamais le cas pour les sols réellement destinés à l'agriculture et étudiés dans ce travail.
- Le comportement des micropolluants organiques est étudié dans deux sols pédologiquement très différents.

Le désavantage à travailler sur ces champs expérimentaux est que les quantités d'amendements apportées aux différentes parcelles dépassent assez fortement la moyenne d'épandage appliquée en Suisse. Le but des analyses effectuées sur ces sites expérimentaux est donc moins de connaître les taux de PAH et de PCB en valeur absolue comme dans les chapitres 5 et 6, que de comparer l'effet de contamination de plusieurs types d'amendements. Les taux de  $\Sigma$ PAH et de  $\Sigma$ PCB détectés dans les différentes parcelles sont rassemblés dans le tableau 11.

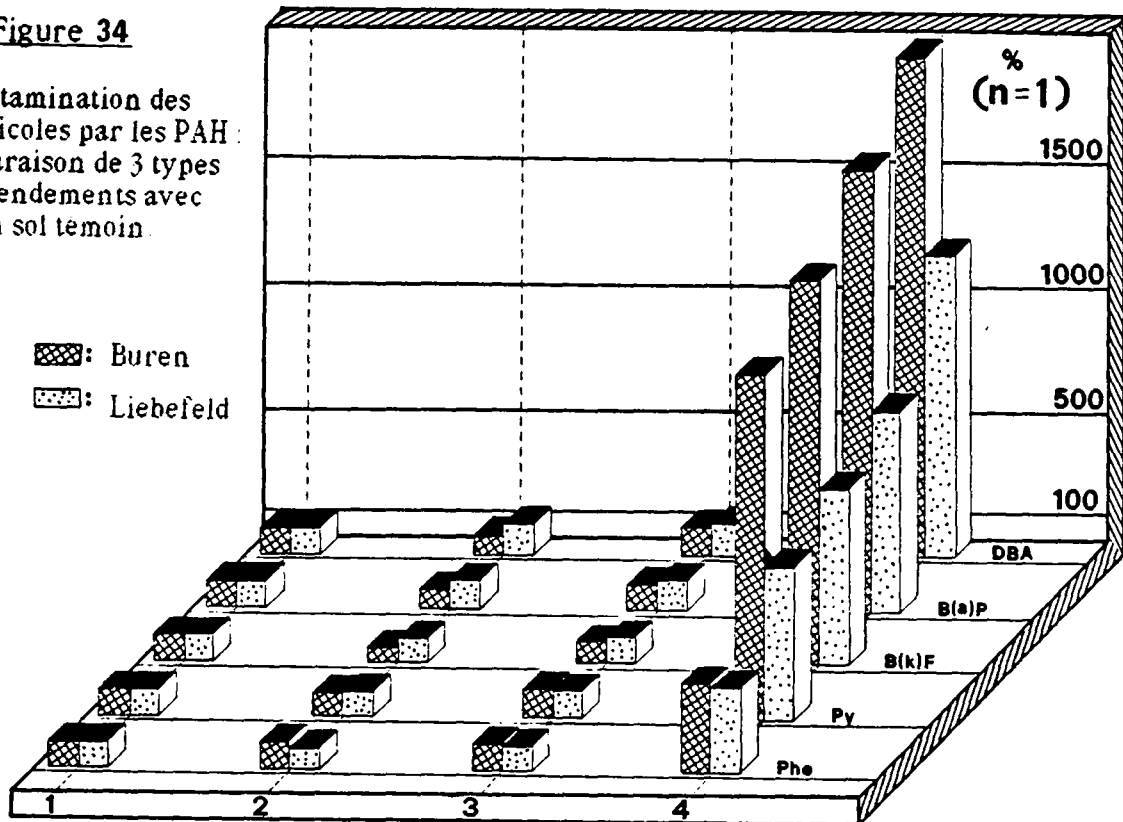
TABLEAU 11: Concentration en micropolluants des sols des champs expérimentaux de la Station Fédérale en Chimie Agricole de Liebefeld (ng/g P.S.).

	$\Sigma$ PAH		$\Sigma$ PCB	
	sol sableux limoneux (Liebef.)	sol argileux (Büren)	sol sableux limoneux (Liebef.)	sol argileux (Büren)
-Sol de référence	320	240	21	43
-Fertilisants min.	321	213	15	228
-Lisier de porc	356	272	104	116
-Boue d'épuration	2361	2664	273	210

Les résultats détaillés concernant certains PAH précis et les  $\Sigma$ PCB se trouvent respectivement rassemblés sur les figures 34 et 35. On y observe les points suivants :

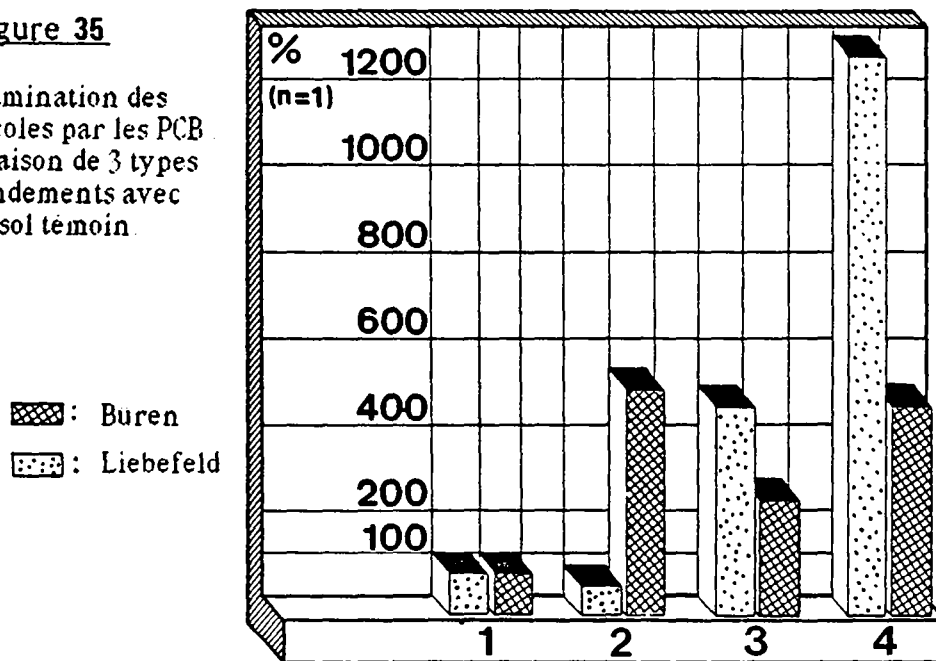
**Figure 34**

Contamination des sols agricoles par les PAH : comparaison de 3 types d'amendements avec un sol témoin.



**Figure 35**

Contamination des sols agricoles par les PCB : comparaison de 3 types d'amendements avec un sol témoin.



- 1 = Sol de référence (= 100%).
- 2 = Sol amendé en fertilisants minéraux.
- 3 = Sol amendé en lisiers de porc.
- 4 = Sol amendé en boue d'épuration.

n = nombre d'analyses effectuées.

- L'accroissement des PAH dans les parcelles amendées en boue d'épuration est considérable par rapport à celui des parcelles amendées en fertilisants minéraux ou en lisier de porc. L'action polluante de ces deux derniers types d'amendements est nulle en 10 ans de temps.
- Le cas des PCB, illustré à la figure 35, est différent : comme pour les PAH, les boues d'épuration sont principalement responsables de la contamination des champs expérimentaux, mais cette fois l'action polluante des lisiers de porc doit être prise en considération. Cette constatation ne nous étonne qu'à moitié puisqu'on sait que les PCB pénètrent dans les tissus d'animaux (vaches, porcs) de diverses façons et peuvent donc se retrouver dans leurs excréments [Fries 1982, Baxter et al. 1983].
- La haute teneur en PCB enregistrée sur les parcelles de Büren amendées en fertilisants minéraux (228 vg/g M.S.) n'a pu être expliquée. Une contamination accidentelle n'est pas à exclure.

#### 8) ETUDE DE LA PENETRATION EN PROFONDEUR DES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES DANS LES SOLS.

Dans les mêmes champs test de Liebefeld et de Büren, des prélèvements réguliers ont été faits jusqu'à 80 cm de profondeur dans les parcelles amendées en boue d'épuration. La figure 36 montre que globalement la teneur en PAH et PCB à 40 cm de profondeur n'atteint plus que 20 à 40% de celle détectée en surface. La même constatation a été faite à Ependes où à deux reprises des analyses ont été faites en surface et à 40 cm de profondeur. Le comportement des 10 PAH dans le sol sableux-limoneux et argileux est similaire. Une exception cependant, le phénanthrène semble pénétrer plus profondément dans le sol argileux que tous les autres PAH. A cet égard il est intéressant de faire un rapprochement avec la figure 34 sur laquelle on remarque que cette substance ne s'est pas tellement accumulée dans le sol argileux amendé en boues en comparaison des autres PAH.

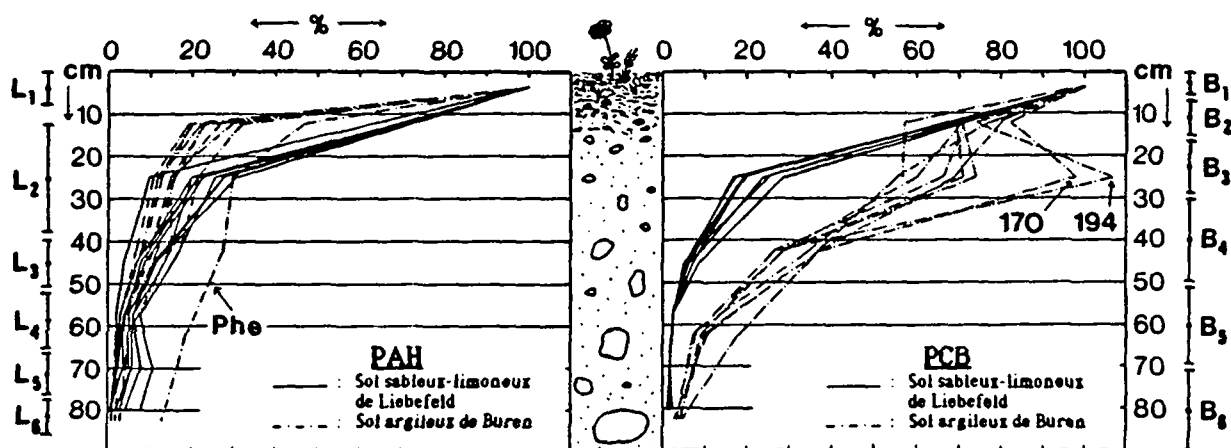


Figure 36 : Pénétration en profondeur dans les sols de Liebefeld et de Büren de 10 PAH (Phe, Ft, Pyr, B(a)A, B(e)P, B(b)F, B(k)F, B(a)P, DB(a,h)A, B(g,h,i)P) et de 10 PCB (No IUPAC 28, 95, 110, 118, 138, 153, 170, 180, 187, 194). 100% = concentration de surface, 0-7 cm. L<sub>i</sub> et B<sub>i</sub> = profondeur des carottes de sondage.

Les PCB ont des comportements différents dans les deux sols. Ils pénètrent de façon plus importante dans le sol argileux et ont un comportement bien moins régulier que dans le sol sableux-limoneux. Les congénères 170 et 194 ont à 25 cm de profondeur dans le sol argileux des teneurs équivalentes à celles de la surface (0-7 cm) et correspondent respectivement à un hepta- et un octochlorobiphényle.

9) ESTIMATION DE LA CONTAMINATION EN PAH ET EN PCB DES SOLS AGRICOLES PAR LES ENGRAIS DE FERME.

Le problème de l'apport des PAH par les fumiers et les lisiers est délicat à traiter car il est probable qu'une partie des micropolluants présents dans les engrais de ferme étaient déjà présents sur les pâturages. Certains animaux de ferme peuvent en broutant absorber des micropolluants organiques apportés sur la surface du sol par les précipitations atmosphériques. Ils peuvent aussi être contaminés par l'absorption d'aliments stockés dans des silos dont le revêtement intérieur était contaminé par des PCB [De Alencastro et al. 1984].

Le paragraphe 7 a montré que les lisiers de porc peuvent contaminer les sols de façon importante en PCB. Il nous a paru intéressant d'analyser plus systématiquement la teneur en PAH et PCB des engrais de ferme et d'estimer leur capacité de contamination des sols agricoles par rapport à celle des boues d'épuration.

Un échantillonnage d'excréments de vaches a été fait dans 12 exploitations agricoles situées entre les villes de Lausanne et Fribourg. Les teneurs en PAH et PCB détectées sont indiquées dans le tableau 12. Afin de connaître les quantités de PAH et de PCB apportées par le fumier bovin aux sols, il faut disposer de chiffres exprimant les quantités moyennes de fumier épandues sur les sols cultivés par année. De tels chiffres sont inexistant, que ce soit à l'Office Fédérale de la Statistique ou plus généralement dans la littérature scientifique.

TABLEAU 12: Contamination en PAH et PCB des sols cultivés par les engrais de ferme.

MPO	Teneurs en MPO de 12 échant. ( $\mu\text{g/kg P.S.}$ )	Apport sur les sols cultivés ( $\mu\text{g.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ )	
		MIN.	MAX.
Phe	33,1 $\pm$ 21,6	8,9	35,8
An	2,7 $\pm$ 2,1	0,7	2,9
Ft	29,1 $\pm$ 24,2	7,8	31,4
Py	33,8 $\pm$ 23,9	9,1	36,5
B(k)F	13,4 $\pm$ 14,0	3,3	14,5
B(a)P	25,6 $\pm$ 27,3	6,9	27,7
DBA	3,5 $\pm$ 3,9	0,9	3,7
BP	22,8 $\pm$ 25,2	6,2	24,7
$\Sigma\text{PAH}$	311,6 $\pm$ 245,4	84,1	336,5
$\Sigma\text{PCB}$	60,2 $\pm$ 16,7	16,2	65,0

Le "landwirtschaftliches Handbüchlein" [Wirz 1986] conseille cependant des épandages de fumier compris entre 10 et 40 tonnes par hectare et par année.

Tenant compte de ces données et sachant que les fumiers bovins ont un taux de matière sèche de  $27,0\% \pm 3,1$ , une estimation de l'apport en PAH et en PCB par les fumiers bovins sur les champs cultivés peut être effectuée. Les chiffres se trouvant dans le tableau 12, sont de valeur purement indicative. La grande différence entre les apports de PAH par les boues (Tableau 10) et par les fumiers résiderait dans le fait que les fumiers apportent davantage de PAH de poids moléculaire lourd dans les sols cultivés. On peut supposer que les PAH de faible poids moléculaire sont en partie dégradés dans l'organisme des animaux.

Globalement les apports de PAH et de PCB par les engrais de ferme (10 à 40 T. M.F./ha/an) seraient du même ordre de grandeur que ceux provoqués par un épandage de boue d'épuration équivalant à 1 T. M.S./ha/an.

Il faut cependant tenir compte de l'observation faite au paragraphe 7 qui signale que les lisiers de porcs n'ont eu aucune influence en 10 années de temps sur la contamination de fond en PAH des champs expérimentaux de Liebfeld et de Büren.

Où est la vérité entre ces deux observations ? Nous pensons que le niveau de contamination des excréments et des lisiers d'animaux de ferme dépend beaucoup du type d'animal, de l'état de contamination de l'alimentation et de celui des champs sur lesquels ils ont l'habitude de paître.

#### 10) ESTIMATION DE LA CONTAMINATION EN PAH ET EN PCB DES SOLS AGRICOLES PAR LES FERTILISANTS MINÉRAUX ET LES AGENTS DE TRAITEMENT DES CULTURES.

Le paragraphe 7 a montré qu'en toute probabilité les fertilisants minéraux devraient avoir un impact très limité dans la contamination des sols agricoles par les PAH et les PCB. Dans le but de vérifier cette observation et aussi de voir l'influence d'un épandage de désherbant sur la teneur en PAH et en PCB d'un sol agricole, le test suivant a été effectué : Deux parcelles de 10m<sup>2</sup> chacune du site No 7 (Tableau 8) ont été, l'une amendée en un fertilisant minéral classique et l'autre traitée par un désherbant sélectif (Arélon-S, Tableau 14). Sur la base des résultats analytiques présentés dans le tableau 13 nous avons constaté qu'au seuil de 99% de certitude il n'y a statistiquement aucune différence de concentration en  $\Sigma$ PCB entre la parcelle sans traitement et les parcelles traitées.

TABLEAU 13: Teneurs en  $\Sigma$ PCB des parcelles test du site No 7.  
Moyenne de 5 analyses ( $\mu\text{g/kg P.S.}$ )

Parcelle sans traitement	Parcelle + fertilisant minéral	Parcelle + Désherbant
2,6 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,4

Les teneurs en PAH et en PCB d'un engrais NPK pur du commerce et de 6 agents de traitement purs ont été déterminées. La liste des produits commerciaux est indiquée dans le tableau 14:

TABLEAU 14: Liste des produits commerciaux analysés à l'état pur.

Produit	Définition [Siegfried Agro 1986]	Dose(1/ha)
Engrais NPK	Engrais classique, azote, phosphore, Potassium.	
ANITENE-S	Désherbant mixte pour céréales et cultures fruitières.	2 - 3
ARELON-S	Désherbant contre les graminées adventices dans les céréales.	2 - 3
CYCOCEL-EXTRA	Hormones végétales pour accroître la résistance des céréales à la verse.	1 - 3,5
IMPACT	Fongicide à action préventive et curative pour les céréales.	1
PERTHRINE	Pyréthrine de synthèse pour l'arboriculture et les grandes cultures.	0,02%

L'engrais NPK était exempt de toute contamination que ce soit en PAH ou en PCB. Dans les agents de traitement, seulement quelques traces de PAH lourds ont été détectées : B(a)P, B(k)F. Ce sont aussi les PAH auxquels le type de détecteur utilisé (détecteur de fluorescence) est le plus sensible.

Ces analyses montrent nettement que les fertilisants minéraux classiquement utilisés en agriculture ainsi que les agents de traitement ne sont pas des sources de PAH et de PCB dans les sols agricoles. Des cas accidentels de contamination ne sont cependant pas à exclure.

#### 11) CONCLUSIONS DE CETTE PARTIE DE LA RECHERCHE

L'épandage de boues d'épuration est un facteur de contamination des sols agricoles en micropolluants organiques. Cette observation est confirmée par d'autres recherches, tels que celle de Davis et al. (1981) ainsi que celles de Borneff et al. (1973) et Ellwart (1976). Ces deux dernières recherches utilisent des composts de boues d'épuration, généralement plus contaminés en micropolluants organiques.

Une étude récente montre que la persistance des micropolluants organiques dans les sols serait d'autant plus importante que les épandages de boues sont importants [Demirjian et al. 1987]. Cette persistance est fortement liée à la teneur en matières organiques du sol, elle-même liée à la quantité de boue d'épuration épandue [Fairbanks et al. 1984].

Il est important cependant de relativiser cet apport de polluants par les boues en le comparant aux autres sources possibles de contamination :

Premièrement, l'apport de  $\Sigma$ PAH et de  $\Sigma$ PCB par les précipitations atmosphériques est important. Pour les  $\Sigma$ PCB cet apport semble être d'une importance équivalente quelle que soit la situation du champ étudié, à proximité d'une grande ville ou en pleine campagne. Ce n'est par contre pas du tout le cas pour les  $\Sigma$ PAH. La position du champ étudié est déterminante quant à l'importance de la contamination de base du sol en ces micropolluants. Les retombées atmosphériques, sèches ou humides, sont chargées de particules sur lesquelles sont adsorbés les PAH, provenant en grande partie du chauffage urbain et des industries. Ces retombées contaminent de façon bien plus importante les sols situés à proximité d'une ville qu'un épandage de boues ne pourrait le faire.

Deuxièmement, les engrais de ferme sont aussi une source d'apport de micropolluants dans les sols. Bien que nous n'ayons pas trouvé de chiffres permettant de comparer les épandages annuels de boues et d'engrais de ferme, il apparaît que les apports de  $\Sigma$ PAH et de  $\Sigma$ PCB par les engrais de ferme seraient du même ordre de grandeur que ceux provoqués par un épandage de boues d'épuration équivalant à 1 T. M.S./ha/an.

Troisièmement, les fertilisants minéraux et les agents de traitement des cultures ne sont pas des sources de  $\Sigma$ PAH et de  $\Sigma$ PCB dans les sols agricoles. Quelques cas de contamination accidentelle ne sont cependant pas à exclure.

Les boues d'épuration, les précipitations atmosphériques, et les engrais de ferme ont donc chacun une part de responsabilité dans la contamination en  $\Sigma$ PAH et  $\Sigma$ PCB des sols agricoles. Nous avons tenté de chiffrer ces responsabilités en se basant sur une boue d'épuration moyennement contaminée au niveau helvétique (Figure 25) et épandue à un taux maximal de 2,5 T. M.S./ha/an déduit de l'ordonnance fédérale sur les boues d'épuration [D.F.I 1984].

Ces chiffres sont à considérer avec la plus grande prudence étant donné l'incertitude permanente qui règne sur les valeurs d'épandage, caractéristique de ce type d'étude (Fig. 37).

Cette analyse ne serait cependant pas correcte sans insister sur le fait que les boues d'épuration d'une part, ainsi que les précipitations et les engrais de ferme d'autre part, apportent au sol des PCB et des PAH d'un type très différent. Les précipitations et les engrais de ferme apportent des PAH et des PCB de poids moléculaire plus lourd que les boues d'épuration. Ce sont des PCB et des PAH moins solubles et moins dégradables.



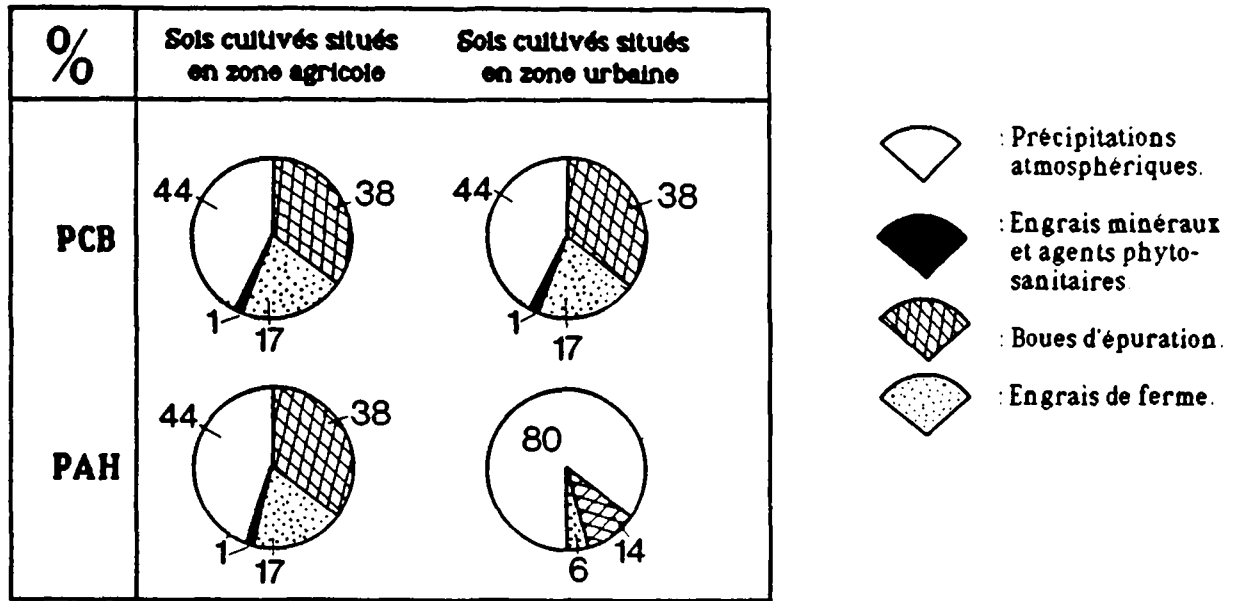


Figure 37 : Pondération des différentes sources de contamination des sols agricoles par les PCB et les PAH.

Les PAH apportés par les précipitations sont de surcroît de nature nettement plus cancérigène que ceux apportés par les boues. L'état de contamination en PAH des sols agricoles situés dans le voisinage immédiat d'une grande ville est donc de nature très préoccupante.



## **CHAPITRE 4**

### **Contamination des sols par les hydrocarbures polycycliques aromatiques : application des tests respirométriques à l'étude du comportement de la microflore terrestre.**

*Le chapitre précédent a mis en évidence quelles étaient les voies de pénétration des micropolluants organiques dans les sols agricoles.*

*A partir du moment où les micropolluants organiques sont incorporés au sol, ils peuvent interférer avec le biotope (par exemple avec le complexe argilo-humique) d'une part, et avec la biocénose d'autre part. Les relations complexes existant entre les polluants organiques et les constituants du sol ne seront pas discutées dans ce travail. Il s'agit d'un domaine de recherche tellement vaste qu'à lui seul il peut former une spécialisation de toute une équipe de chercheurs [Bollag 1983].*

*Dans ce chapitre il sera question de l'impact des hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH) sur les micro-organismes du sol. Le chapitre suivant traitera des rapports entre les micropolluants organiques et les lombriciens. Ces deux chapitres sont difficilement dissociables puisque les lombriciens vivent en véritable symbiose avec les micro-organismes du sol.*

*Ce chapitre montrera au moyen de 2 tests respirométriques que la nature du sol joue un rôle déterminant dans l'impact que peuvent avoir des PAH sur la respiration des micro-organismes du sol.*

#### **1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DES TESTS RESPIROMETRIQUES**

Les tests respirométriques sont les tests recommandés par le groupe d'écotoxicologie du programme des tests chimiques de l'OCDE. Ils sont destinés à visualiser la toxicité de produits chimiques sur les micro-organismes du sol, par la mise en évidence de perturbations du cycle de l'azote [OECD 1981a] et du carbone [OECD 1981b]. A quelques rares exceptions près, les études utilisant les tests respirométriques ont toutes été effectuées dans le but de mieux comprendre l'impact des pesticides sur les micro-organismes du sol. Dans la bibliographie nous n'avons rencontré aucune recherche étudiant le comportement des micro-organismes du sol suite à une pollution par des hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH). Ces tests sont cependant utilisés à plusieurs reprises pour suivre, après marquage de la substance organique étudiée, la dégradation de micropolluants organiques dans différents sols par piégeage et titrage du  $^{14}\text{CO}_2$ . Le marquage de la substance organique se fait principalement par le remplacement d'un  $^{12}\text{C}$  à un endroit précis de la molécule par une de ses formes isotopiques ( $^{13}\text{C}$  ou  $^{14}\text{C}$ ). Ces tests ont été faits pour les polychlorobiphényles (PCB) [Scharpenseel et al. 1978] et pour les PAH [Bulman et al. 1985].

### 1.1. Les systèmes à flacons respirométriques

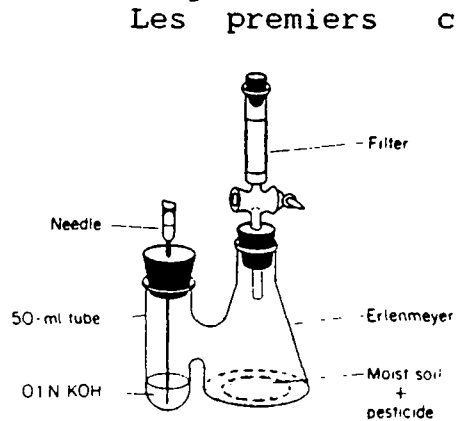


Figure 38 : Flacon respirométrique selon Bartha et al. (1965)

Les premiers chercheurs ayant utilisé les flacons respirométriques sont Bartha et Pramer (1965). La quantité totale de CO<sub>2</sub> et de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> est piégée dans du KOH se trouvant dans le même récipient. Ce dispositif a deux défauts majeurs. Le premier est que les produits de dégradation volatils ne sont pas retenus par la soude. Le second est que des tests respirométriques de longue durée peuvent conduire à des situations d'anaérobiose. En effet, les micro-organismes du sol consomment l'oxygène du flacon. Si un renouvellement d'air n'est pas prévu dans le flacon, la proportion d'azote augmentera jusqu'à induire une situation anaérobie (Fig. 38).

### 1.2. Les systèmes à flux discontinu :

Le système à flux discontinu que nous allons utiliser a été mis au point par différents chercheurs de façon assez simple par Goswami et Koch (1976) et par Kearney et Kontson (1976), en passant par un système très complexe de Parr et Smith (1969). En plus de pouvoir fonctionner sous différentes atmosphères et sous des pressions positives ou négatives, ce système a le grand avantage de pouvoir mesurer des pertes de substances par volatilisation. Il peut aussi identifier les produits volatils par adsorption dans des liquides, tels que l'éthanolamine ou le polyéthylène glycol, ou sur des solides tels que des mousses de polyuréthane [Kearney et al., 1976] ou du polyvinyl-polypyrrolidone [Trocmé, 1985]. Une description plus détaillée de ce système sera donnée au chapitre 5.1.

### 1.3. Les systèmes intégrés :

Le reproche majeur fait aux deux systèmes précédents est que l'activité microbienne des sols peut être très rapidement altérée, de manière souvent irréversible, en fonction de la manière de stockage de ces sols. L'activité des micro-organismes peut être maintenue en laissant vivre en permanence une végétation sur le sol. Ces systèmes permettent de suivre simultanément la dégradation des polluants, leur volatilisation, la pénétration des polluants dans les plantes, la respiration des micro-organismes et finalement la percolation. Un bon exemple est la recherche effectuée par Best et al. (1974) dont le montage est illustré à la figure 39. Ces systèmes ont le désavantage d'être très coûteux et de fournir des résultats physiques, chimiques et biologiques peu spécifiques de la substance organique étudiée.

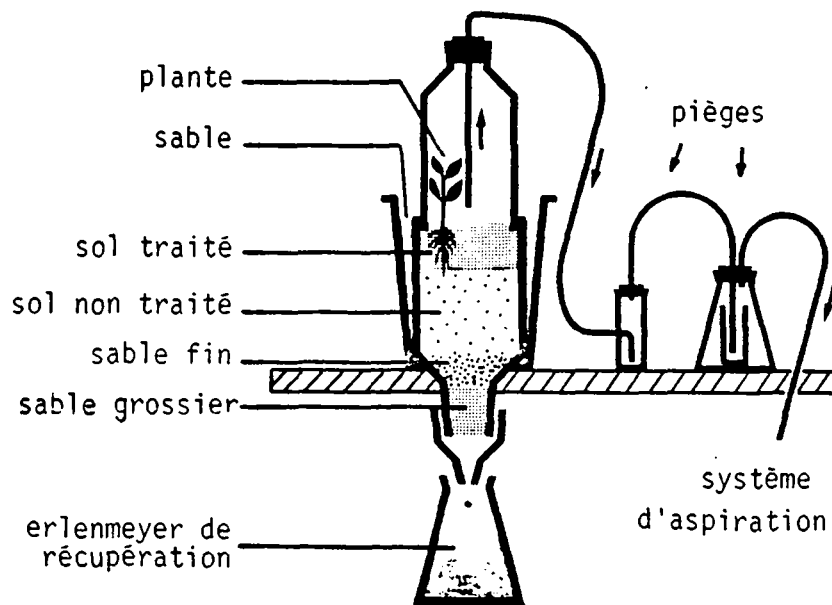


Figure 39 : Système respirométrique intégré selon Best et al. (1974).

## 2. POSITION DU PROBLEME ET BUT DE CETTE PARTIE DE LA RECHERCHE.

Les 4 processus qui provoquent la disparition des PAH apportés par des épandages de boue d'épuration sur les sols agricoles ont été décrits au paragraphe 4 du premier chapitre. Au total 1 mois suffit pour faire disparaître ce qui a été amené comme PAH par la boue d'épuration (Chapitre 3).

Une exception importante à ce qui précède a été constatée sur les champs expérimentaux de la Station fédérale de recherche agricole et sur l'hygiène de l'environnement de Liebefeld. Ces champs expérimentaux ont été décrits lors de l'étude des effets à long terme de l'épandage de boues d'épuration : chapitre 3, §7. Ils sont répartis sur deux sites pédologiquement très différents. Le premier site se trouve à Liebefeld et le second à Büren. Certaines parcelles de ces deux sites ont été amendées en boues d'épuration à raison d'environ 12 tonnes de matières sèches à l'hectare, ce qui représente entre 5 et 10 fois plus que la pratique agricole courante. Sur ces parcelles on constate une forte accumulation de PAH par rapport aux parcelles témoins. Le détail des analyses est indiqué sur le tableau 15.

TABLEAU 15: Teneur en micropolluants organiques des différents sols étudiés (µg/Kg poids sec).

PAH	Abrév	Agr.	LR	LB	BR	BB
Phénanthrène	Phe	10±2	19	118	29	143
Anthracène	An	1	3	24	3	23
Fluoranthène	Ft	13±2	33	197	45	281
Pyrène	Pyr	14±3	68	359	81	465
Benzo(a)anthracène	B(a)A	4±1	28	132	31	210
Benzo(e)pyrène	B(e)P	9±1	40	224	63	330
Benzo(b)fluoranthène	B(b)F	13±3	53	256	71	412
Benzo(k)fluoranthène	B(k)F	2±1	12	72	17	144
Benzo(a)pyrène	B(a)P	4±2	26	164	42	242
Dibenz(a,h)anthracène	DBA	1	4	22	6	37
Benzo(g,h,i)perylène	BP	4±1	21	136	34	221

Agr. = Moyenne de la contamination de fond de deux sols agricoles de Suisse (Montherod, VD et Ependes, FR)

LR = Champ test de Liebefeld : sol de référence.

LB = Champ test de Liebefeld : sol amendé en boue d'épuration.

BR = Champ test de Buren : sol de référence

BB = Champ test de Buren : sol amendé en boue d'épuration.

Le but de cette partie de la recherche est d'essayer de savoir pourquoi ces PAH se sont accumulés dans les champs expérimentaux amendés en boues d'épuration de la Station de Liebefeld, ce qui est contraire aux observations faites concernant les sols agricoles amendés en boues habituellement rencontrés en Suisse. Deux hypothèses peuvent être avancées :

- La cinétique de disparition des PAH dans le sol est plus lente que celle de l'apport des PAH par les boues d'épuration.
- L'apport de grandes quantités de boues d'épuration perturbe la microflore du sol qui ne peut plus dégrader normalement les PAH.

### 3. DESCRIPTION DES SOLS ETUDIES

En plus de la description des deux sites au chapitre 3, §7, des analyses supplémentaires ont été faites en octobre 1985 par le laboratoire de pédologie de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, ceci afin de mieux caractériser les sols, amendés ou non en boues d'épuration, qui serviront aux tests respirométriques. Les résultats sont indiqués sur le tableau 16.

L'examen des chiffres obtenus nous montre deux points importants:

- Le sol sableux-limoneux de Liebefeld semble avoir été nettement plus influencé par la boue d'épuration que le sol argileux de Buren. Ceci se remarque surtout dans la teneur en carbone organique total, en azote total, en sodium, potassium et calcium échangeables et dans la capacité d'échange cationique. Les écarts de valeurs entre le sol de référence et celui amendé en boue sont bien plus importants pour le site de Liebefeld que pour celui de Buren.

TABLEAU 16: Caractéristiques des 4 sols pour les incubations

ANALYSES	Liebefeld sol de référence	Liebefeld sol amendé en boues	Büren sol de référence	Büren sol amendé en boues
pH eau	6,22	7,01	7,45	7,45
pH KCl	4,78	5,96	6,30	6,23
carbone org. total (%)	2,50	3,40	3,80	3,70
azote total (%)	0,34	0,45	0,49	0,48
C/N	7,30	7,50	7,70	7,70
cations échangeables :				
.Na	0,77	0,90	0,74	0,78
.K	0,27	0,40	0,43	0,40
.Ca	6,99	14,42	17,56	19,56
.Mg	0,55	0,57	0,95	0,84
.acidité	0,14	0,12	0,09	0,12
.capacité d'échange cationique (CEC)	8,71	16,42	19,77	21,70
Fe Tamm (%) (*)	3,50	18,40	3,20	14,00
Fe Mehra-J (%) (**)	7,60	28,00	14,30	26,50

\*: Fe Tamm = phases ferriques amorphes, à l'exclusion des complexes humiques du fer.

\*\*: Fe Mehra-J = Fe Tamm + les formes cristallisées du fer [Jeanroy et al. 1984].

- La boue d'épuration occasionne une très nette augmentation des deux formes du fer (amorphe et cristallisée) dans les sols amendés en boue des deux sites, due aux quantités importantes de chlorure ferrique utilisées dans les stations d'épuration pour précipiter les impuretés.

#### 4. LES MOYENS EXPERIMENTAUX ET LES PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS.

Trois types de tests "in vitro" ont été mis en oeuvre pour essayer de donner une réponse au problème posé au paragraphe 2 :

- 1. Des tests respirométriques. Ces tests étudient l'activité microbienne d'un milieu par la mesure du dégagement du CO<sub>2</sub> [Goswami et al. 1976, Morel 1977].
- 2. Des analyses de l'adénosine triphosphate (ATP). Ces analyses déterminent la quantité de biomasse pondérée par son activité [Maire 1983].
- 3. Des études cinétiques. Ces études mettent en évidence, l'apparition ou la disparition de molécules ou d'ions dans un milieu à un moment donné.

Nous avons prélevé l'horizon de sol de 0 à 7 cm de profondeur sur une surface de 500 cm<sup>2</sup> en un bloc compact. Nous avons ainsi 4 blocs de sol (sol de référence et sol amendé en boues de Liebefeld et de Büren) qui furent immédiatement congelés au moyen de neige carbonique. Dans la suite de ce chapitre, chaque fois que nous parlerons de "sol de Liebefeld ou de Büren", il s'agira de l'horizon 0-7 cm.

## 5. LES TESTS RESPIROMETRIQUES.

### 5.1. Le dispositif respirométrique

Pour étudier le comportement des PAH dans les sols de la station, le dispositif d'incubation décrit par GUCKERT (1968) a été choisi. Le but de ce test est de suivre l'activité microbienne de chaque sol étudié par la mesure du dégagement de  $\text{CO}_2$ . Cette méthode a été utilisée dans différentes études d'impact de polluants métalliques [DOELMAN et al. 1979 et 1984, BRUNNER et al. 1984] ou organiques [PARR et al. 1969, MITTERER et al. 1981, BAYER et al. 1982, SCHINNER et al. 1983]. La figure 40, reprise de MOREL (1977), décrit le dispositif global. La figure 41 donne une vue détaillée d'une cellule d'incubation.

Chaque cellule d'incubation est constituée d'un erlenmeyer de 500 ml contenant environ 100 g de sol à étudier. La figure 41 montre que les erlenmeyers sont équipés de têtes en verre à deux embouts (1 et 2) permettant l'entrée ou la sortie des gaz. Les bouchons en caoutchouc, habituellement utilisés dans d'autres tests d'incubation, ne pouvaient à aucun prix être utilisés dans nos tests d'incubation. En effet, ces bouchons contiennent dans de nombreux cas des résidus de PAH, ce qui pourrait fausser les résultats analytiques. Afin d'assurer l'étanchéité de l'ensemble, une couronne de cire à cacheter a maintenu le système hermétiquement clos.

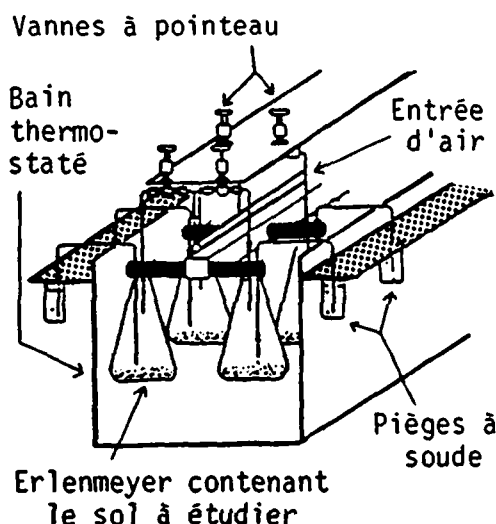


Figure 40: Dispositif d'incubation (Morel 1977)

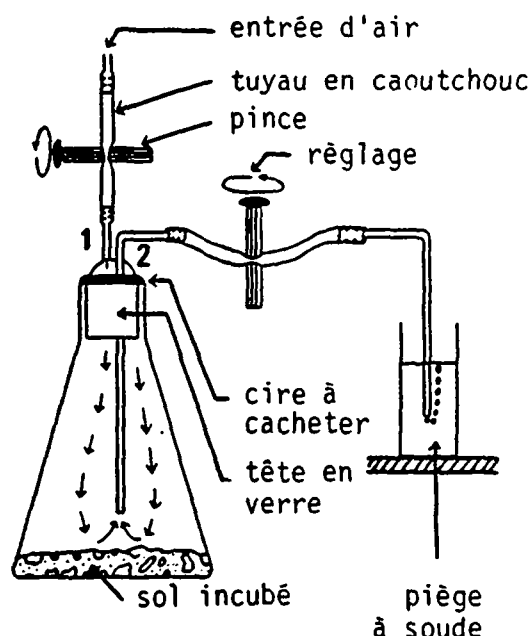


Figure 41: Détail d'une cellule d'incubation



Le fonctionnement du dispositif est très simple : le métabolisme des micro-organismes du sol produit du  $\text{CO}_2$  par la dégradation de substances organiques. Ce  $\text{CO}_2$  s'accumule dans l'erlenmeyer et ne peut s'en échapper car les deux entrées de la tête en verre sont bouchées par des pinces. Au bout d'un temps défini, l'atmosphère des erlenmeyers est renouvelée au moyen d'air pur par ouverture des deux pinces. Un flux d'air entre dans l'erlenmeyer par l'embout 1 et en ressort par l'embout 2, entraînant avec lui tout le  $\text{CO}_2$ . Le  $\text{CO}_2$  est fixé dans un piège à soude. Il est dosé ensuite par conductimétrie, cette méthode étant la plus rapide [Jaggi 1976]. Les erlenmeyers sont gardés à une température constante par immersion dans un bain thermostaté à 25 °C. Les échantillons de sol sont incubés à un taux d'humidité équivalent au 4/5 de la capacité au champ. Ces conditions de température et d'humidité placent le sol dans des conditions optimales pour l'activité microbienne. Les 4 bains thermostatiques contenant chacun 12 unités d'incubation sont enfermés dans des coffrages en bois durant toute la durée de l'incubation. Ces coffrages évitent que les PAH des échantillons de sol puissent entrer en contact avec la lumière ce qui pourrait éventuellement les dégrader.

## 5.2. Les deux tests d'incubation.

Deux tests d'incubation ont été effectués durant cette recherche:

Le test d'incubation 1 compare la respiration des 2 sols de référence à celle des deux sols amendés en boues et ceci sans aucun apport supplémentaire de PAH.

Le test d'incubation 2 compare la respiration des 2 sols de référence et des 2 sols amendés en boue d'épuration, mais cette fois en apportant une quantité supplémentaire de PAH à ces sols. Les vitesses de dégradation des PAH ont été comparées dans les 4 sols étudiés.

### 5.2.1. Le protocole expérimental du test d'incubation 1.

Le test d'incubation 1 a consisté à comparer la respiration des 2 sols de référence à celle des deux sols amendés en boues, et ceci d'une part à l'état brut et d'autre part en apportant à ces 4 sols 10% de leur teneur en carbone total sous forme de glucose.

Pourquoi du glucose ? Le glucose est un substrat énergétique facilement biodégradable. Il donne un coup de fouet à l'activité microbienne en ne modifiant toutefois pas trop le cortège des micro-organismes par sa présence, ce que d'autres types de substrats, tels que la luzerne ou la paille, feraient peut-être.

Deux aspects sont pris en compte durant ce premier test d'incubation :

Le premier consiste à voir si de grandes différences existent dans les courbes respirométriques des sols de référence et celles des sols amendés en boues.

Le second est d'observer s'il existe une cinétique de dégradation des PAH au cours des 21 jours que dure le test. Si oui, celle des sols témoins est-elle différente de celle des sols amendés en boues et celle des sols sans traitement-glucose est-elle différente de celle avec traitement-glucose ?

La répartition des échantillons ainsi que la fréquence de renouvellement de l'atmosphère des erlenmeyers est illustrée sur le tableau 17. Le choix a été fait de ne sacrifier pour chaque type de sol que 2 échantillons (au 2ème et au 5ème jour). Ceci afin d'obtenir des courbes de respiration les plus exactes possibles.

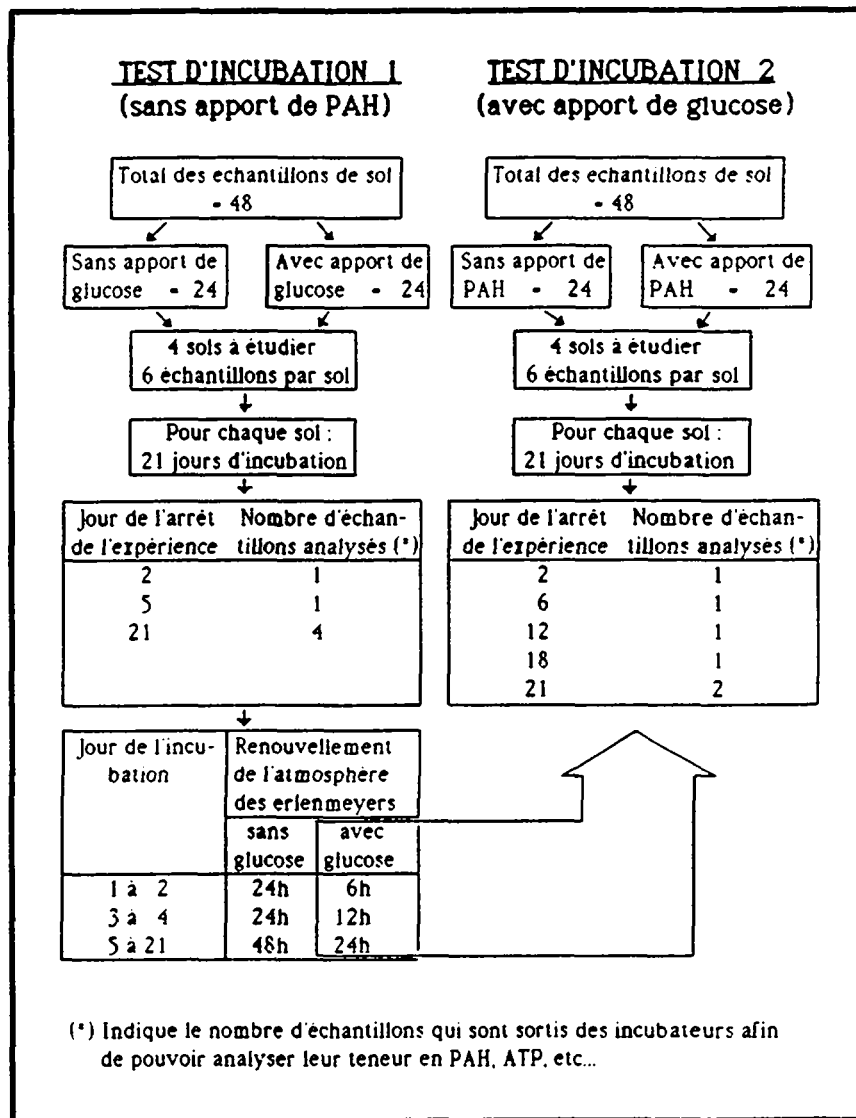


Tableau 17: Clef de répartition des échantillons et fréquence de renouvellement de l'atmosphère des erlenmeyers des deux tests d'incubation.

### 5.2.2 Les résultats du test d'incubation 1.

Les résultats du test d'incubation 1 sont illustrés sur les figures 42A et 42B en ce qui concerne le test sans apport de glucose et sur les figures 43A et 43B pour le test avec apport de glucose. Nous y représentons respectivement le taux de minéralisation journalier et cumulé des deux tests en fonction de la durée d'incubation.

Le taux de minéralisation M est exprimé par la relation suivante:

$$M = \frac{\text{Quantité de carbone dégagée sous forme CO}_2}{\text{Quantité totale de carbone de l'échantillon}} \times 100$$

La figure 42A nous montre une courbe de minéralisation journalière qui comporte 3 parties distinctes :

- Un taux de minéralisation de départ plus élevé que celui enregistré durant le reste de l'incubation traduisant un état de stress de début d'expérience vraisemblablement dû à l'humidification des échantillons,
- Un affaiblissement de la minéralisation à partir du 2ème jour dû à l'épuisement des réserves de substances organiques facilement biodégradables,
- Une légère reprise de la minéralisation à partir du 13ème jour, due soit à la minéralisation d'une partie de la biomasse, transformée en nécromasse, soit à la mise à disposition de substances organiques provenant du stock humique du sol.

Les 4 sols étudiés, qu'ils soient ou non amendés en boues, respirent très faiblement. Il suffit, pour s'en rendre compte de comparer leur taux de minéralisation journalier à celui des sols témoins dopés en glucose (Figure 43A), ils respirent environ 100 fois moins ! A ce stade-ci nous n'observons pas de différence de comportement entre les sols témoins et les sols amendés en boues.

A partir du moment où on ajoute du glucose aux 4 sols à étudier nous observons à la figure 43A qu'une nette différenciation se manifeste dans la respiration des sols témoins par rapport à celle des sols amendés en boue. Ceux-ci présentent une courbe de minéralisation en deux parties :

- Les deux premiers jours un important flush de la minéralisation du glucose et d'une fraction des substances organiques apportées par la boue,
- A partir du 3ème jour une chute brutale de l'activité minéralisatrice illustrant la faible réactivité des sols étudiés.

Les courbes de minéralisation des sols témoins ont une toute autre allure et sont constituées de trois parties distinctes :

- Les trois premiers jours une minéralisation modérée d'une matière organique moins facilement dégradable que celle présente dans les sols amendés en boue,
- Du 3ème au 6ème jour une reprise du dégagement du CO<sub>2</sub> due à la dégradation du glucose transformé en polysaccharides,
- A partir du 7ème jour une chute de l'activité minéralisatrice.

La meilleure respiration des sols amendés en boues n'est pas surprenante. Il est connu que l'épandage fréquent de boue d'épuration sur un sol augmente ou modifie sa teneur en matière organique [Varanka 1976, O'Connor 1981], modifie fortement la population microbienne de ce sol [Glathe 1963] et provoque des bouleversements qui se répercutent sur la respiration des micro-organismes de ce sol jusqu'au delà d'une année après l'épandage de la boue [Agbim 1977].

FIGURE 42A

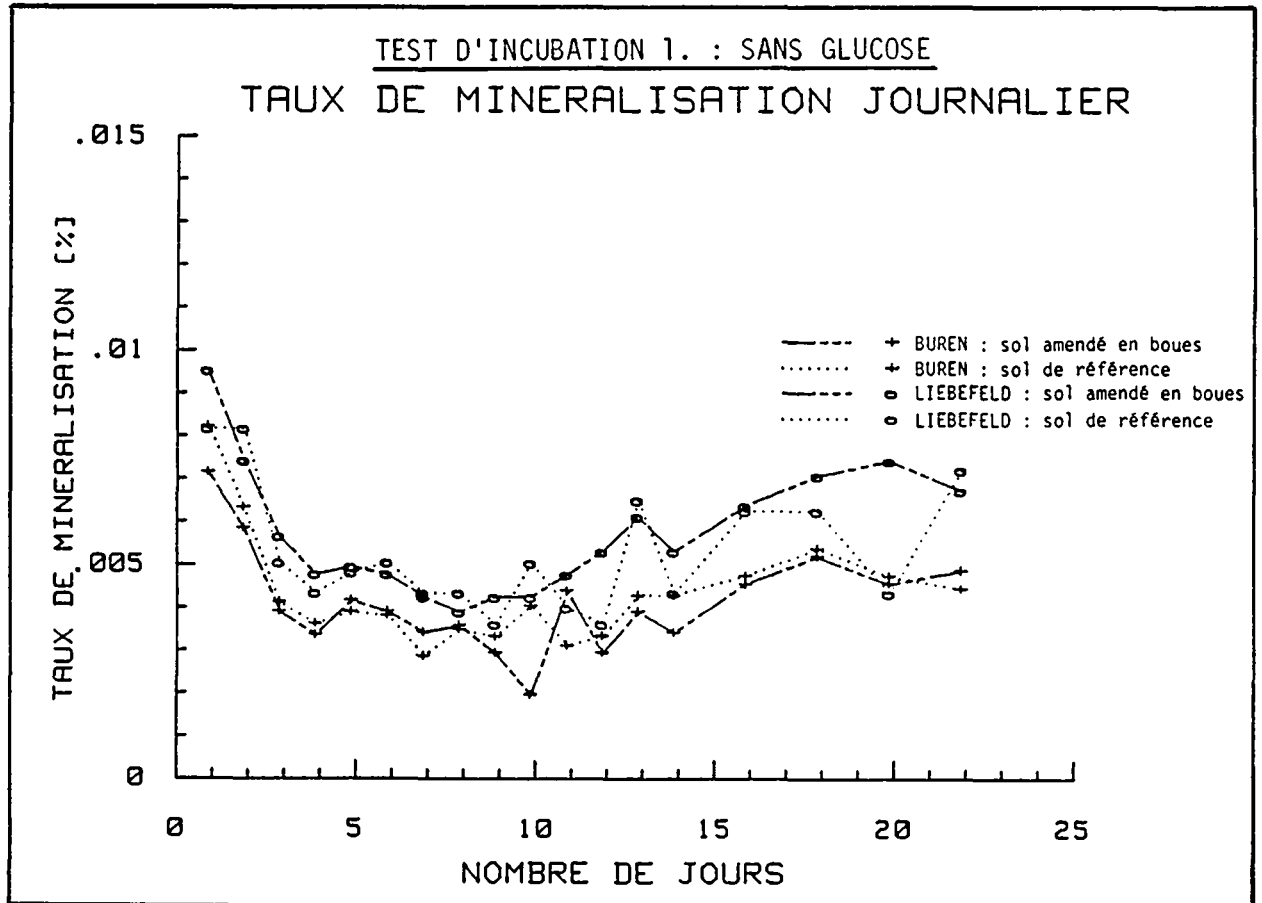


FIGURE 42B

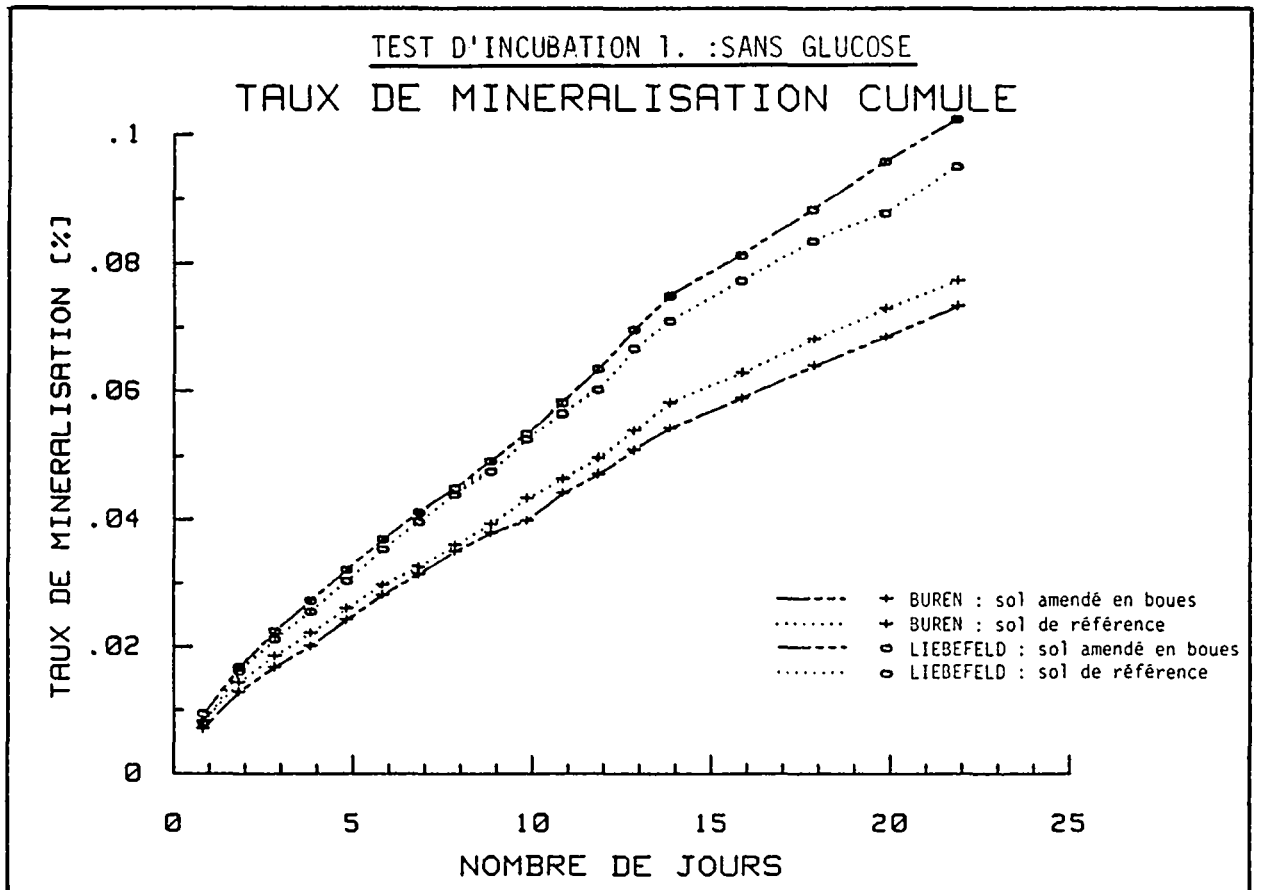


FIGURE 43A

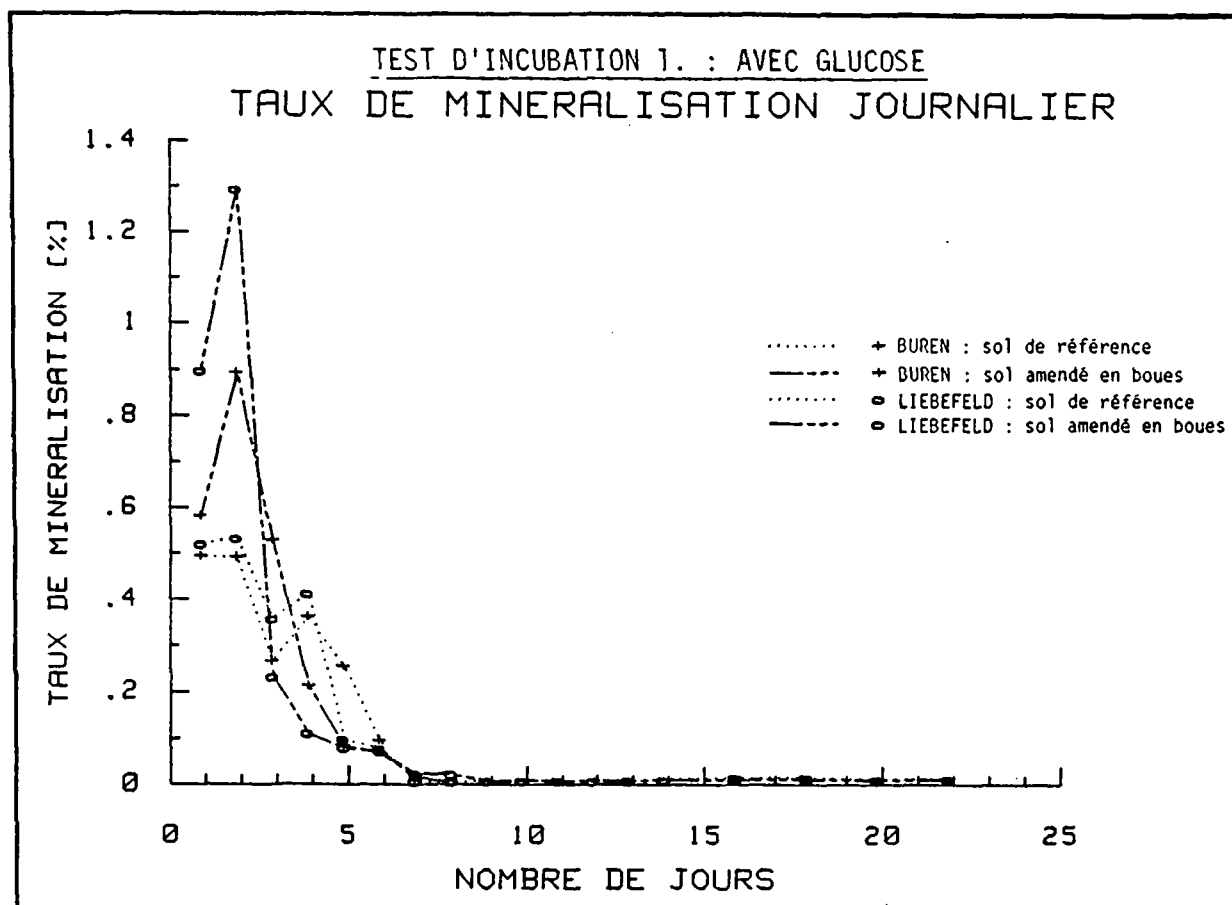
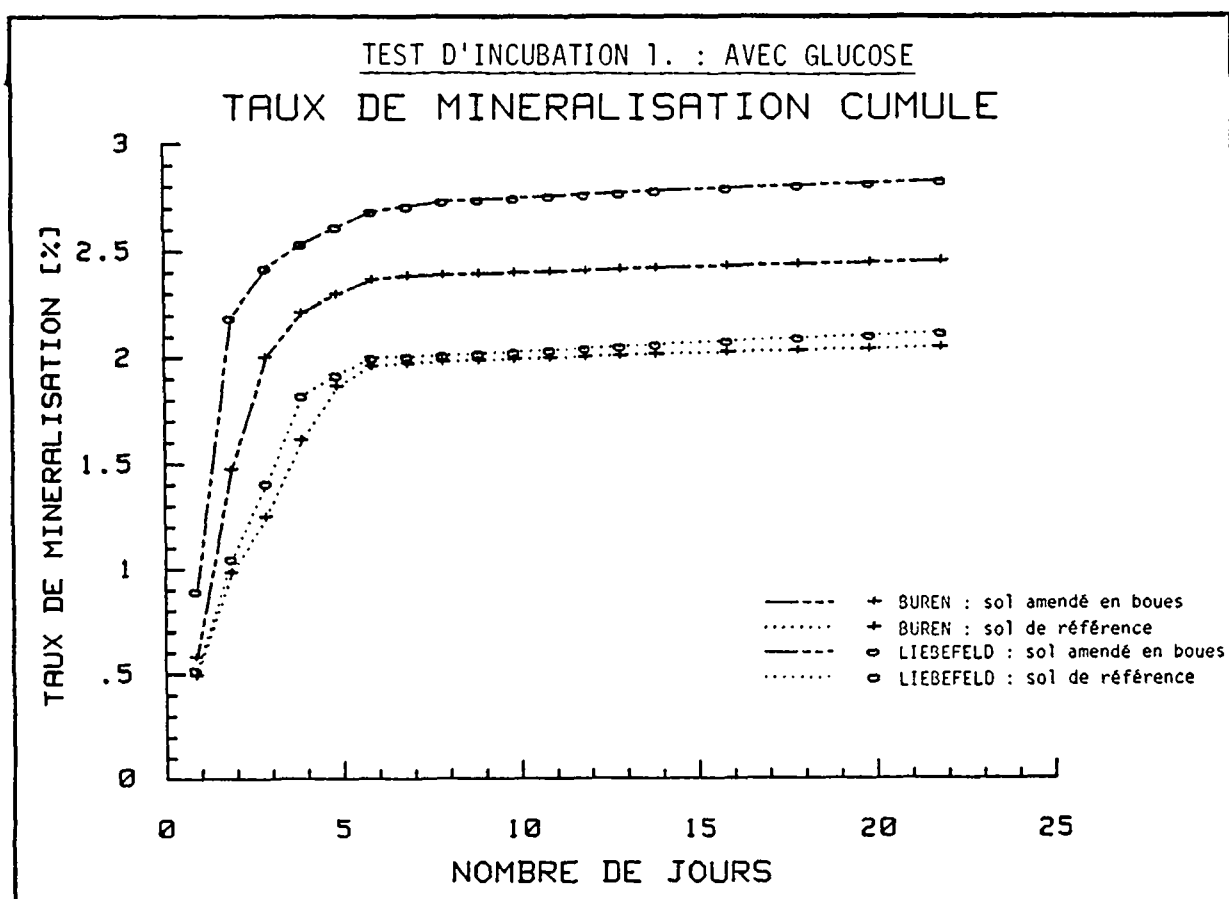


FIGURE 43B



Il est intéressant de noter que les écarts des taux de minéralisation cumulés (Figure 43B) entre le sol-témoin et le sol amendé en boue de Liebefeld sont nettement plus importants que ceux des sols de Büren. C'est une observation qui rejoint l'étude des caractéristiques chimiques des deux sols (Tableau 16).

Du point de vue du comportement des PAH, aucune dégradation n'a été constatée dans les 4 sols étudiés durant toute la durée du test d'incubation 1. Le glucose n'a statistiquement eu aucune influence sur les teneurs en PAH des sols ( $\alpha=0,05$ ).

A ce stade-ci de la recherche aucun élément ne nous permet d'affirmer que l'apport de boue d'épuration affecte la capacité des micro-organismes à dégrader les PAH.

#### 5.2.3. Le protocole expérimental du test d'incubation 2.

Nous avons vu dans le premier test d'incubation que les 4 sols étudiés respirent très faiblement sans apport de glucose et que d'autre part la présence du glucose n'affecte pas la concentration des PAH déjà présents dans les échantillons de sol. Il a donc été décidé pour le second test d'incubation d'incorporer 10% de la teneur en carbone total des échantillons sous forme de glucose.

Le second test d'incubation consiste à comparer le taux de minéralisation journalier et cumulé d'un échantillon-témoin à celui d'un échantillon dopé au moyen de 4 PAH, qui sont : le phénanthrène, le fluoranthène, le pyrène et le benzo(a)pyrène. Nous comparerons l'aptitude qu'auront les 4 sols à dégrader ces 4 PAH et nous verrons si l'apport de ces 4 PAH affecte leur respiration.

La répartition des échantillons ainsi que la fréquence du renouvellement de l'atmosphère des erlenmeyers du second test d'incubation sont illustrées sur le tableau 17. Le choix a été fait de sacrifier davantage d'échantillons pour le test d'incubation 2 que pour le précédent, afin de disposer de courbes cinétiques comparatives précises.

#### *Les critères de choix des 4 PAH:*

La cinétique de dégradation comparée des PAH au cours de ce test respirométrique revêt une grande importance. Un PAH à 3 cycles (Phe), deux PAH à 4 cycles (Ft et Pyr) et un PAH à 5 cycles (B(a)P) ont été sélectionnés afin d'avoir au moins 1 représentant de chaque classe de cycles habituellement rencontrés dans l'environnement. Le fluoranthène et le pyrène sont de surcroît les PAH les plus abondants dans tous les types d'échantillons de l'environnement [Mille et al. 1982, Hites et al. 1975]. Le benzo(a)pyrène quant à lui est un des PAH les plus cancérigènes qui soit [Conney 1982].

#### *Les doses de dopage des 4 PAH:*

Lorsqu'un chercheur doit apporter un polluant organique pur à un échantillon de sol, il se trouve toujours devant le dilemme suivant :

- Soit adopter des teneurs de dopage qui sont du même ordre de grandeur que les concentrations habituellement rencontrés dans l'environnement. Les teneurs en PAH des sols agricoles étant en général assez faibles (tableau 18), on risque dans ce cas de n'obtenir aucune différence dans le comportement respirométrique des sols dopés par rapport aux sols de référence.
- Soit adopter des teneurs de dopage élevées. Il se pose dans ce cas le problème de la signification d'un tel dopage par rapport aux réalités de l'environnement.

Nous avons pris la décision de doper les échantillons de sol à étudier au moyen de concentrations en PAH atteignant 10 fois celles détectées dans les champs-tests de la station. Ce sont des teneurs qui sont détectées en moyenne dans les boues des stations d'épuration [GRIMMER et al. 1978, HOTAR et al. 1979, HAGENMAIER et al. 1979, SUESS 1980, GRIMMER et al. 1980, Mc INTYRE et al. 1981, AICHBERGER et al. 1983]. Le tableau 18 synthétise les concentrations en PAH détectées dans divers types d'échantillons de l'environnement.

Tableau 18: Teneur en PAH d'échantillons de l'environnement, dopage des sols du test d'incubation 2 ( $\mu\text{g/Kg P.S.}$ )

PAH	Phe	Ft	Pyr	B(a)P
-Sols cultivés situés en zone agricole (*)	8-15	10-15	16-26	5-6
-Sols cultivés situés en zone urbaine (*)	10-155	15-298	16-279	14-169
-Boues d'épuration de Suisse (**)	500-6300	550-5300	560-3620	80-2680
-Boues d'épuration étrangères (***)	15-250	20-400	21-360	8-320
-Dopage des sols du test d'incubation 2	2000	5000	5000	2000

- (\*) : Diercxsens P., Tarradellas J. (1987),
- (\*\*) : Le présent travail (chapitre 3, §4),
- (\*\*\*) : valeurs à multiplier par  $10^3$ .

Les valeurs de dopage adoptées se justifient par le fait que le sol cultivé possède, juste après l'épandage de la boue d'épuration, à peu près les mêmes concentrations en PAH que celle-ci.

#### La technique de dopage:

Nous avons tenu à perturber le moins possible la microflore des sols puisque nous voulions précisément étudier leur comportement.

La plupart des références bibliographiques rencontrées réalisent un dopage des sols ou des sédiments par l'intermédiaire d'un solvant organique. Certains chercheurs [Bulman et al. 1985] dopent une aliquote de sol avec les polluants dissous dans un solvant organique. Ensuite ils évaporent le solvant et mélangent le sol dopé à du sol non dopé afin d'obtenir une concentration déterminée des polluants à étudier dans ce sol. D'autres chercheurs [Doyle et al. 1978] dopent directement l'entièreté de l'échantillon de sol toujours par l'intermédiaire d'un solvant organique. Un manque de rigueur est constaté sur deux points :

- Premièrement, rien ne prouve que le solvant organique utilisé pour solubiliser les polluants n'ait pas un effet déterminant sur la microflore du sol.
- Deuxièmement, rares sont les recherches qui mentionnent que les sols non dopés, servant donc de témoins, aient été mis en contact avec le même solvant organique et dans les mêmes conditions que les sols dopés.

Tenant compte de ces observations, il a été décidé que les sols à étudier seraient dopés par l'intermédiaire du glucose, ce qui évite tout contact direct du sol avec le solvant organique.

Nous avons procédé en deux étapes pour le dopage en PAH des 4 sols à étudier.

La première étape a consisté à adsorber une quantité précise de chaque PAH sur les particules de glucose à apporter aux échantillons de sol. Elle tient compte d'une part de la teneur en carbone total des l'échantillons (Tableau 16) et d'autre part du niveau de contamination en PAH auquel on veut arriver (Tableau 18). Pratiquement, un dopage spécifique de glucose a été préparé pour chaque sol. Les quantités nécessaires de PAH pur pour le dopage de 10g de glucose ont été dissoutes dans un peu d'hexane. L'hexane a été dilué en jaugé de précision jusqu'à l'obtention des concentrations désirées. Le glucose et l'hexane contenant les concentrations exactes de PAH ont été introduits quantitativement dans un ballon de 100ml. Une grande partie de l'hexane a été évaporée au moyen du concentrateur rotatif, ce qui a provoqué un contact intime entre les particules de glucose et les PAH. Le reste de l'hexane a été évaporé sous simple courant d'azote. Le ballon contenant le glucose et les PAH a ensuite été hermétiquement fermé et recouvert d'une feuille d'aluminium pour éviter tout contact des PAH avec la lumière. Finalement le ballon a été placé dans un agitateur électrique durant 12 heures.

La seconde étape a consisté à mélanger 7 échantillons de chaque sol étudié avec les quantités nécessaires de glucose contaminé et 7 autres avec du glucose non contaminé. Ensuite un échantillon de chaque sol, contaminé et non contaminé, a immédiatement été congelé et lyophilisé. Ses teneurs en PAH ont ensuite été analysées. Les résultats obtenus figurent sur le tableau 19.



Tableau 19: Taux de récupération du dopage en PAH des 4 sols

S O L	Quantité totale de PAH dans le sol [1] (µg/Kg P.S.)				Quantité de PAH récupérée (µg/Kg P.S.)				Taux de récupération (%)			
	Phe	Ft	Pyr	BP	Phe	Ft	Pyr	Bp	Phe	Ft	Pyr	Bp
LR	2050	5365	5387	2037	1040	3220	3520	806	51	60	65	40
LB	2852	7416	7491	2882	1602	7317	7015	2212	56	99	94	77
BR	2114	5066	5054	2211	1280	3280	3740	946	60	65	74	43
BB	2240	5334	5389	2368	1164	3860	3802	1918	52	72	70	81

LR = Liebefeld, sol de référence  
LB = Liebefeld, sol amendé en boues  
BR = Buren, sol de référence  
BB = Buren, sol amendé en boues

[1] : Dopage +  
concentration en  
PAH initialement  
présente.

Après analyse des teneurs en PAH des échantillons de départ, un taux de récupération a été calculé par rapport à la quantité totale de PAH dans les sols dopés. Les valeurs sont reprises dans le tableau 19. Compte tenu des nombreuses manipulations durant le dopage des sols et durant leur analyse, ces taux de récupération peuvent être considérés comme satisfaisants.

#### 5.2.4. Les résultats du test d'incubation 2 :

##### La minéralisation du carbone.

Les figures 44A à 44D et 45A à 45D illustrent comparativement la respiration des 4 sols étudiés, d'une part avec une simple adjonction de glucose et d'autre part avec du glucose contaminé en PAH. Toutes les courbes de minéralisation obtenues sont constituées de deux parties :

- Les deux premiers jours on observe un important flush dû à la minéralisation du glucose et d'une fraction des substances organiques du sol.
- A partir du 3ème jour on assiste à une chute brutale de l'activité minéralisatrice. Il est à noter que les sols de référence non contaminés en PAH ne présentent plus qu'une très légère reprise du dégagement du CO<sub>2</sub> due à la dégradation des polysaccharides, contrairement au premier test d'incubation (Figure 43A) où cette reprise était plus forte.

Chaque fois que le sol a été contaminé en PAH on observe une inhibition, statistiquement significative, de la respiration des micro-organismes, aussi bien pour les sols de référence que pour ceux amendés en boues d'épuration. Si l'inhibition observée est la même pour les sols de référence et les sols amendés en boues, elle est par contre nettement moins forte dans le sol argileux de Buren que dans le sol sableux-limoneux de Liebefeld.

FIGURE 44A

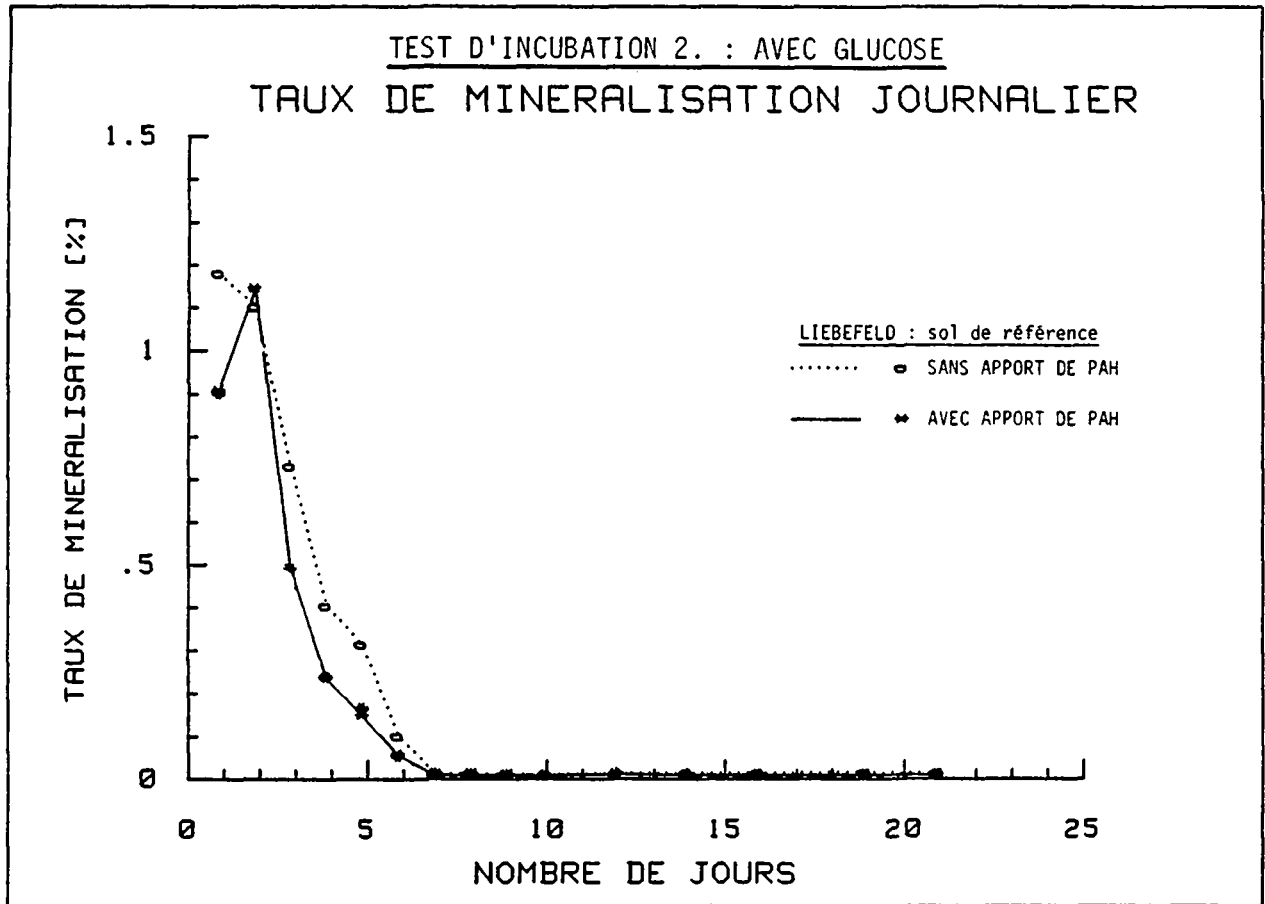


FIGURE 44B

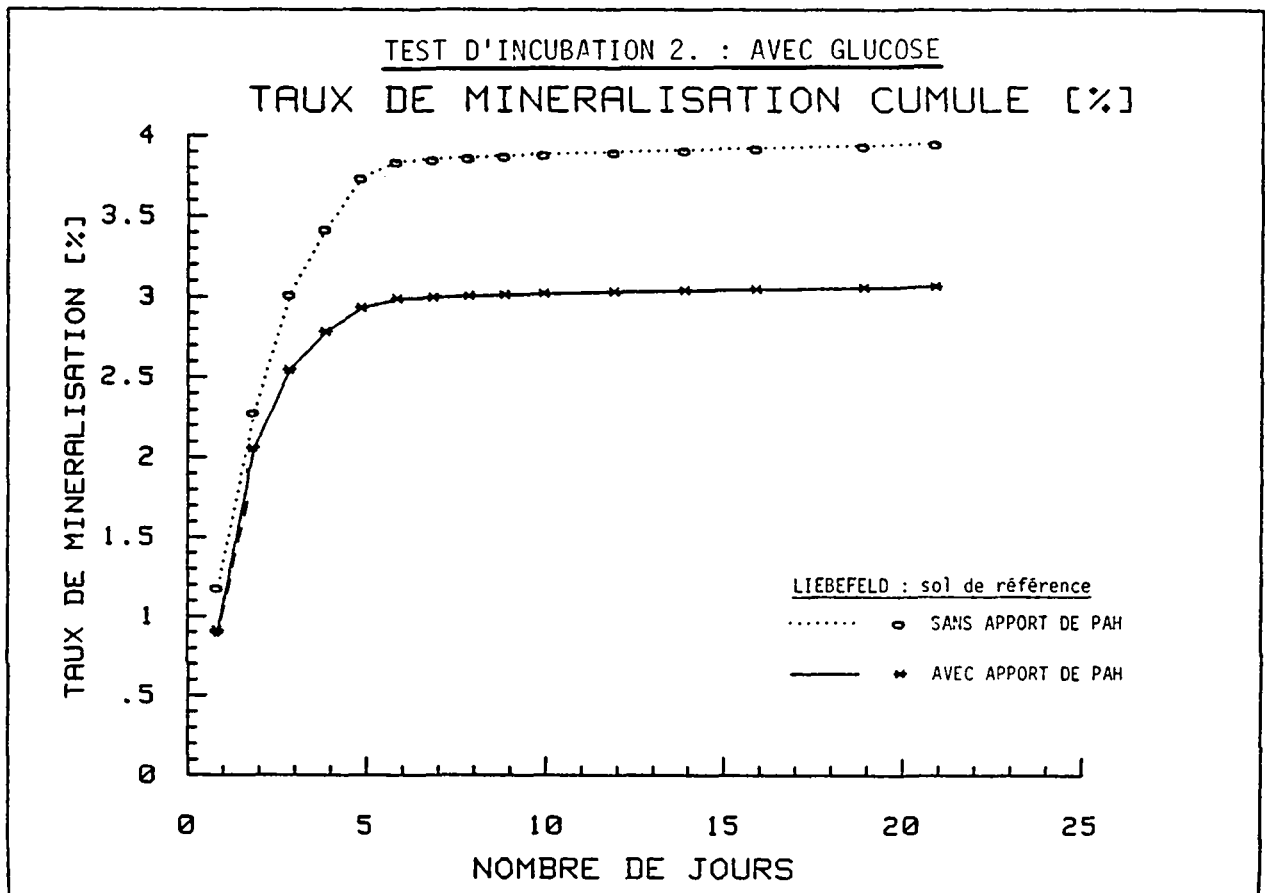


FIGURE 44c

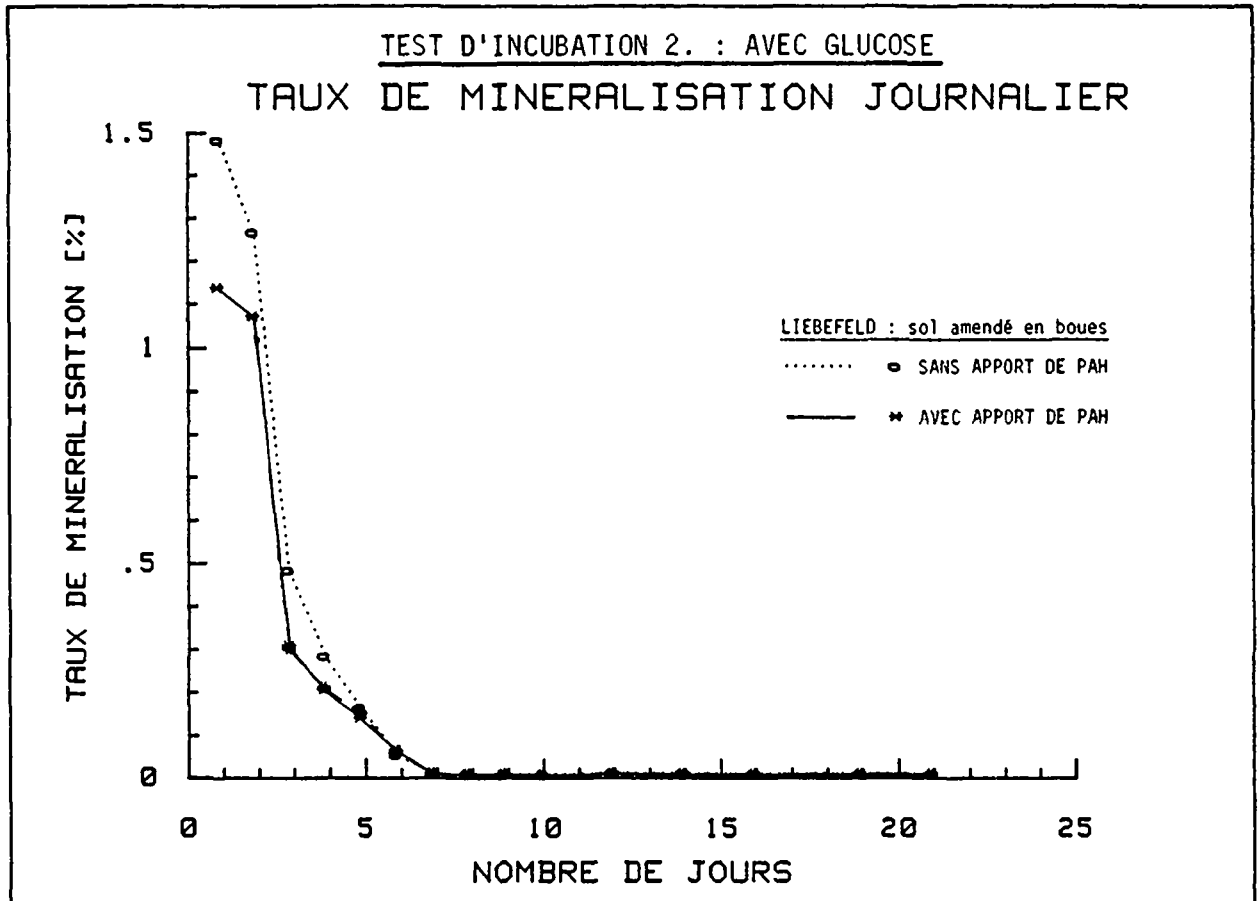


FIGURE 44d

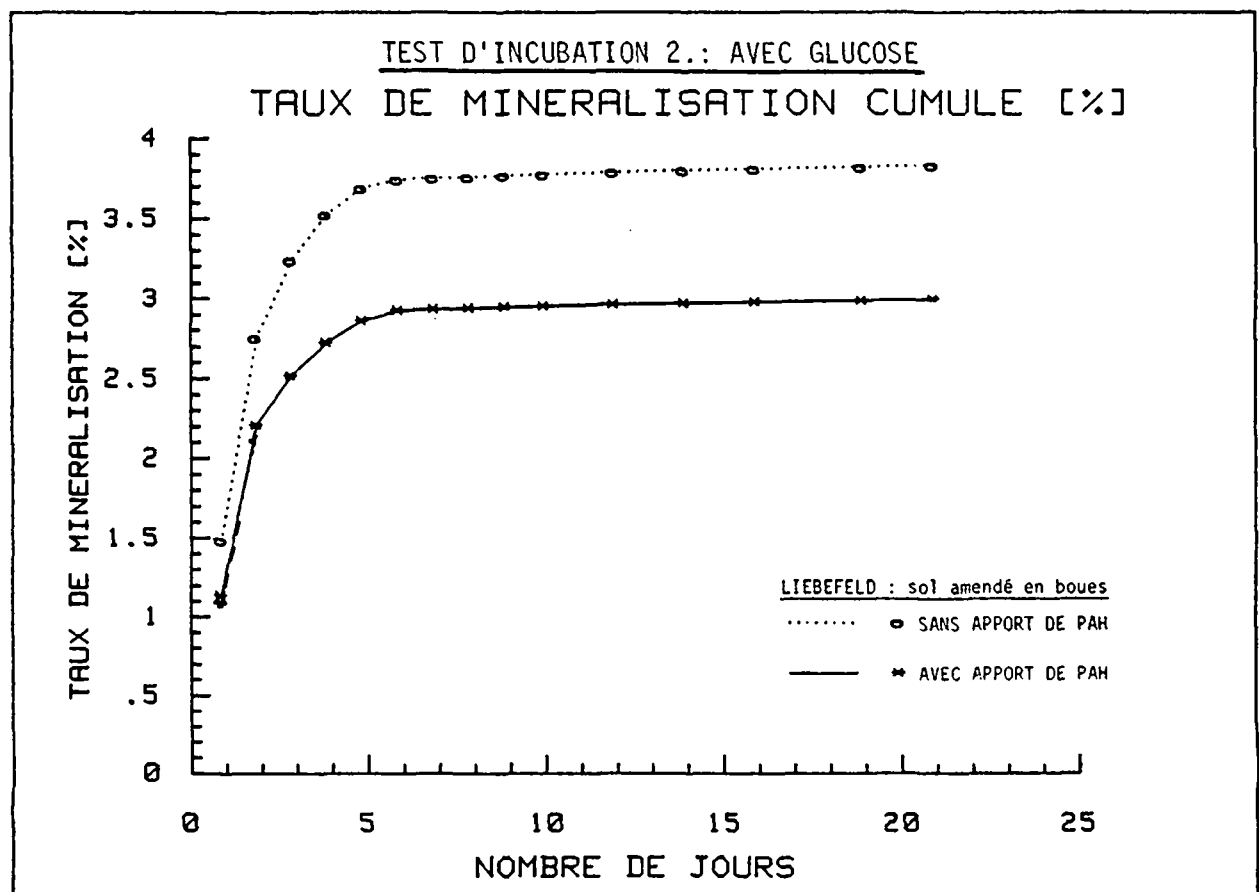


FIGURE 45A

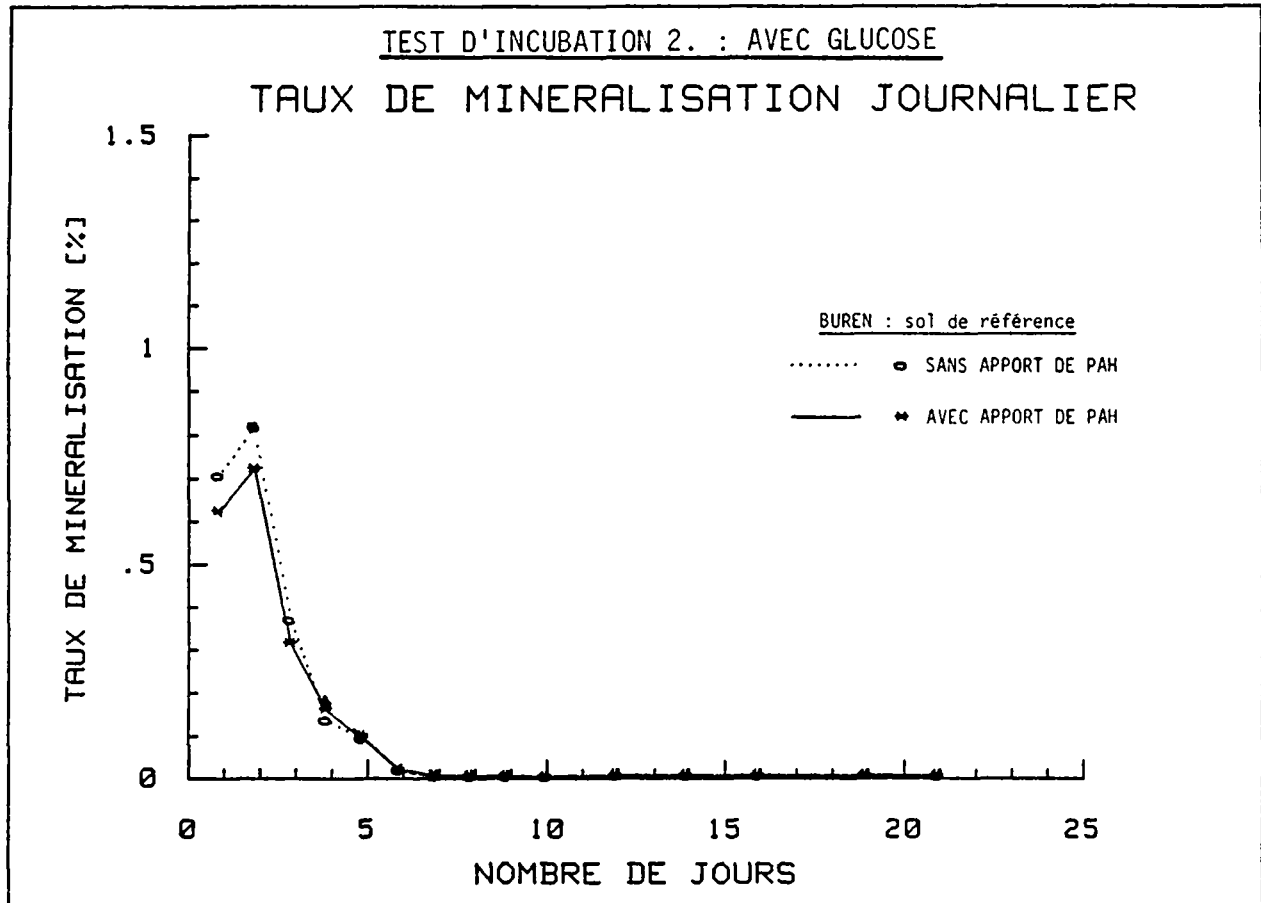


FIGURE 45B

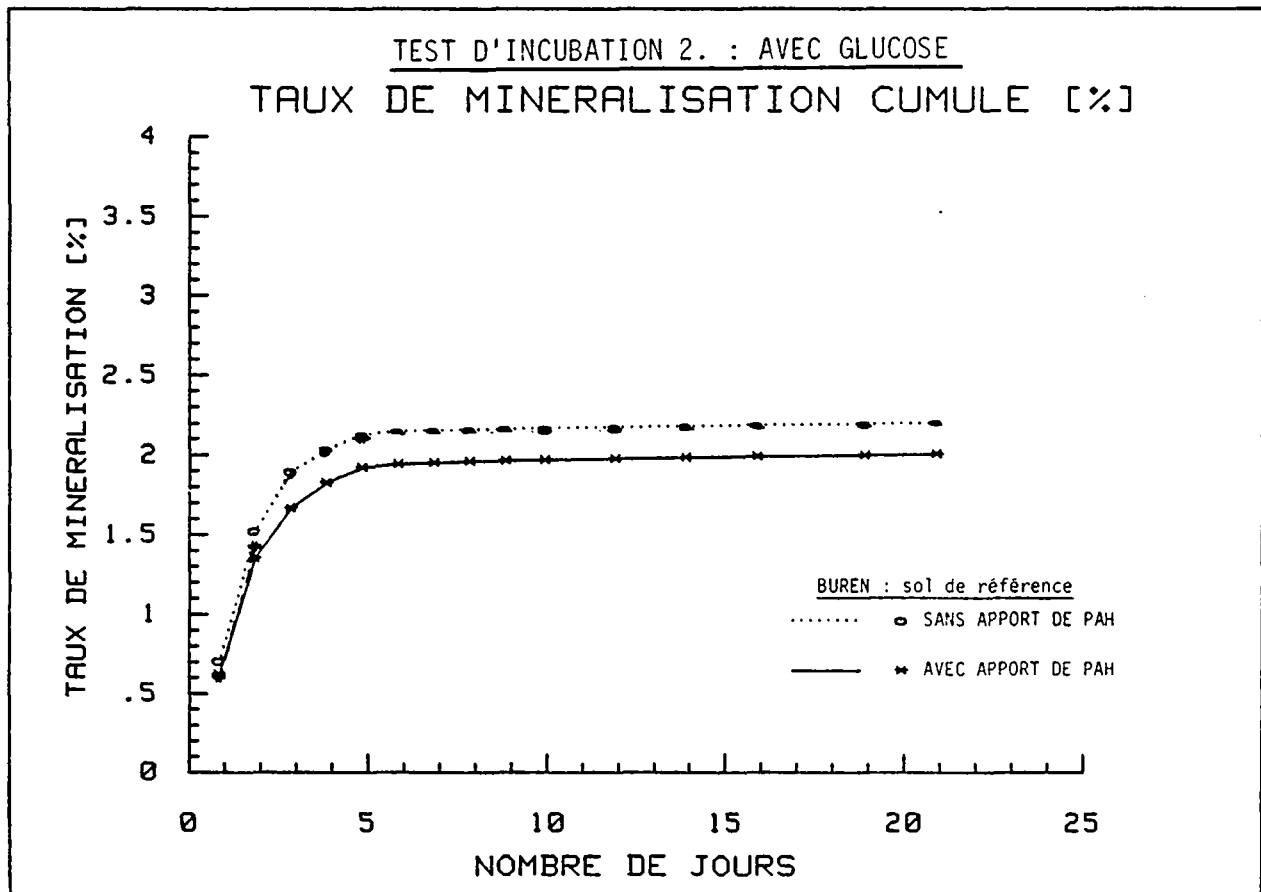


FIGURE 45C

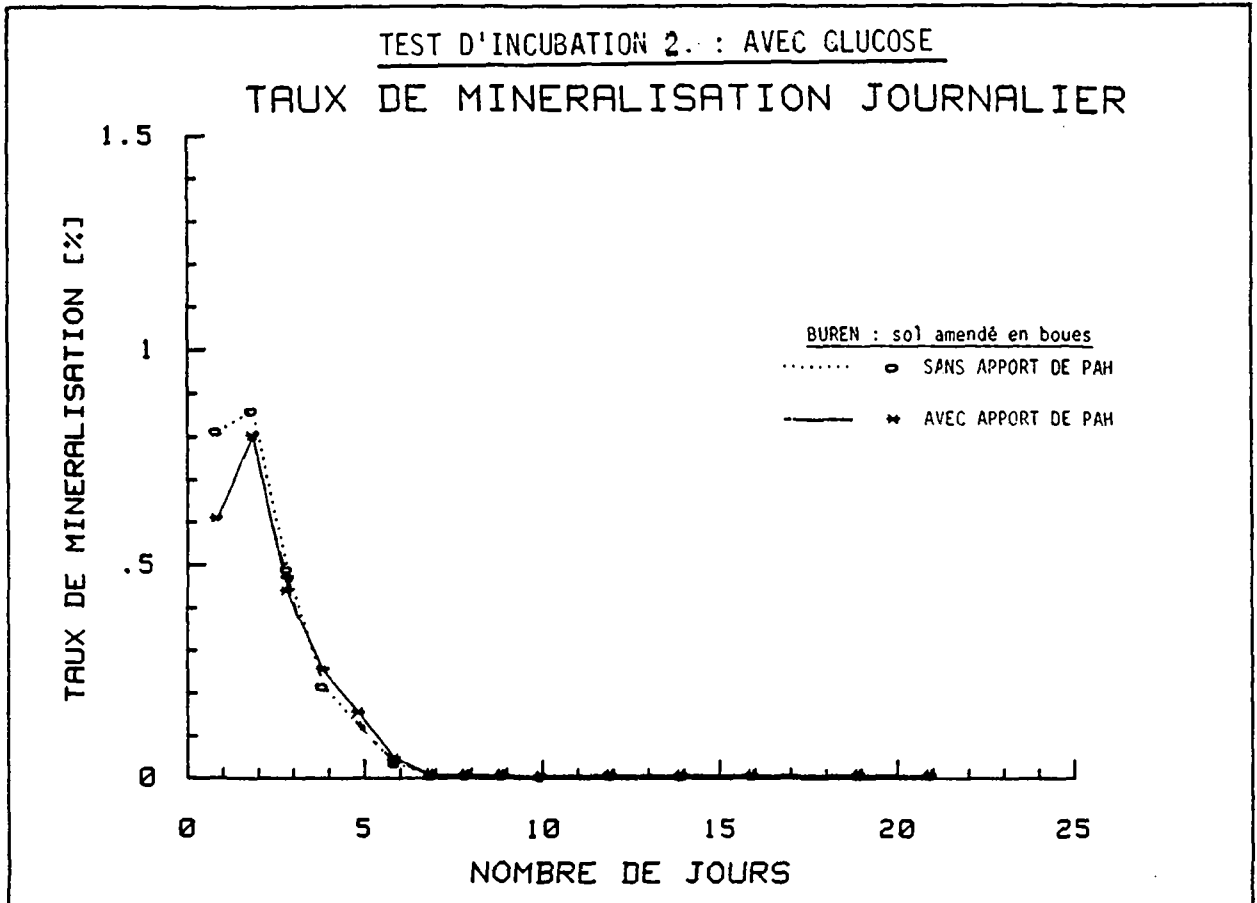
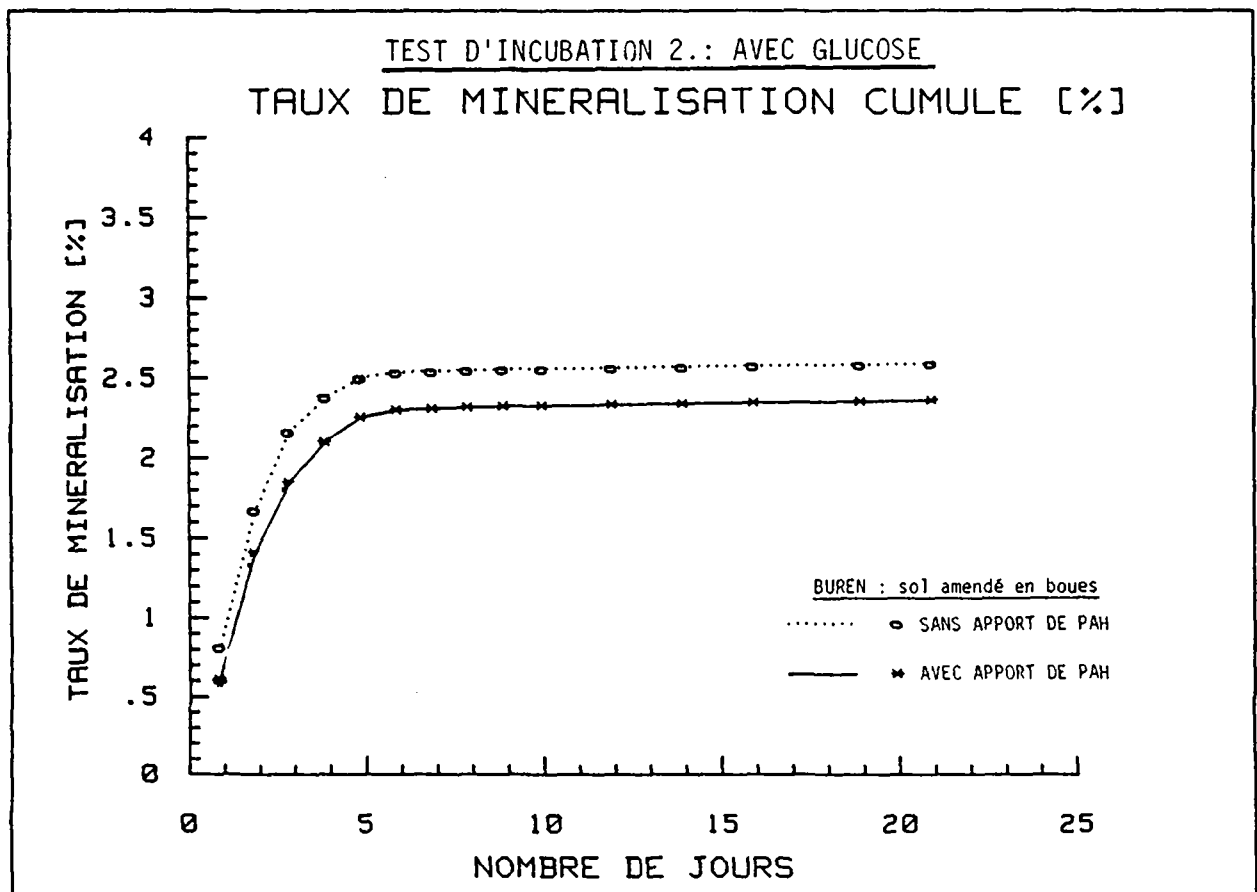


FIGURE 45D



#### Evolution de la biomasse-ATP

L'évolution de la biomasse-ATP est représentée aux figures 46A à 46D. Aucune déduction ne peut être faite de ces résultats. La contamination en PAH des 4 sols étudiés n'a statistiquement pas influencé l'activité de ces sols par rapport aux sols-témoins ( $\alpha=0,05$ ). Le rapport  $\text{CO}_2/\text{ATP}$ , qui donne une expression de l'activité de la biomasse, ne donne pas davantage de résultats interprétables. Les courbes ne sont pas représentées dans ce chapitre.

#### L'impact des 4 PAH sur le cycle interne de l'azote.

L'évolution de l'azote ammoniacal et de l'azote nitrique a été suivie et est respectivement représentée sur les figures 47A à 47D et 48A à 48D. Pour le sol argileux de Büren, les 4 PAH n'ont absolument pas influencé la teneur en  $\text{NH}_4^+$  et en  $\text{NO}_3^-$  du sol de référence ni celle du sol amendé en boues. Le sol de Liebefeld par contre démontre une nette accumulation d'azote nitrique dans le sol de référence. Une accumulation en azote ammoniacal se manifeste surtout dans le sol amendé en boues. La plupart des recherches étudiant les effets de métaux lourds sur les transformations des formes de l'azote dans les sols, en systèmes ouverts, constatent une inhibition quasi générale de ces transformations [Chang et al. 1982, Rother et al. 1982]. Il est paradoxal de constater que dans cette recherche on assiste à une accumulation d'azote nitrique dans le sol incubé, alors que les germes responsables de la production d'azote nitrique sont très sensibles. La même constatation avait été faite par Trocmé (1985) au sujet de la contamination d'un système compost-grès par du 4-nonyl-phénol. L'explication peut être la suivante : l'accumulation d'azote nitrique serait liée à une perturbation de la cinétique du cycle interne de l'azote. Etant donné qu'il se trouve dans un système fermé (incubateurs), l'azote nitrique n'est pas réorganisé par diverses synthèses organiques, comme il le serait dans un système ouvert (champ agricole) dans lequel il s'accumule beaucoup moins.

#### Cinétique de dégradation des 4 PAH, comparaison du comportement des PAH initialement présents à celui des PAH servant au dopage.

Les figures 49A à 49D comparent la persistance du phénanthrène dans les 4 sols non dopés à celle du phénanthrène dans les 4 sols dopés. Ces 4 graphiques ne peuvent cependant être interprétés que si on spécifie les méthodes analytiques choisies. L'analyse du phénanthrène dans les sols non dopés a été effectuée au moyen d'un chromatographe liquide à haute pression (HPLC), équipé d'un détecteur de fluorescence. Les détails de cette analyse sont indiqués en annexe No 2 à la fiche analytique No 10. Le détecteur de fluorescence est très performant. Il nous a permis de quantifier les traces de phénanthrène présentes dans les sols non dopés, ce qui aurait été difficile à faire au moyen de la chromatographie en phase gazeuse. Dans les sols dopés par contre, l'analyse du phénanthrène a été faite par chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur FID (= Flame Ionisation Detector). Les détails en sont fournis sur la fiche analytique No 11. Ces deux analyses ne sont pas équivalentes. Un HPLC, équipé

EVOLUTION DE LA BIOMASSE-ATP (NG/G P.S.)

FIGURE 46A

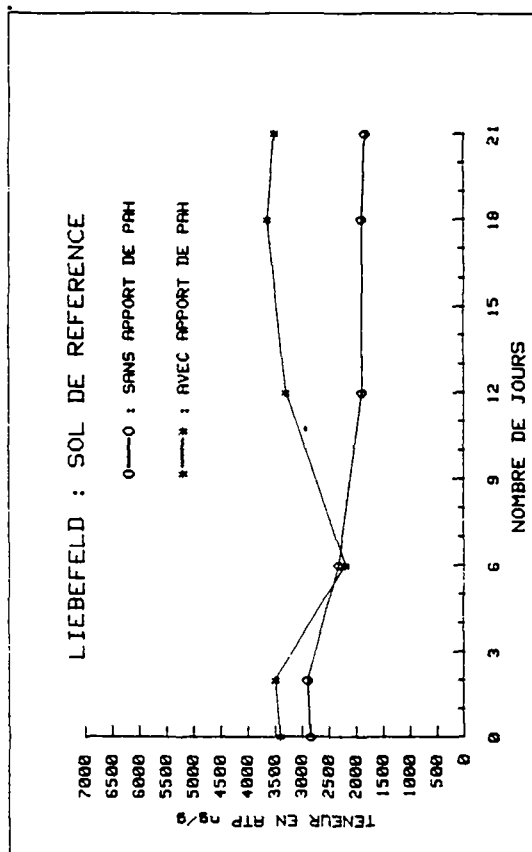


FIGURE 46B

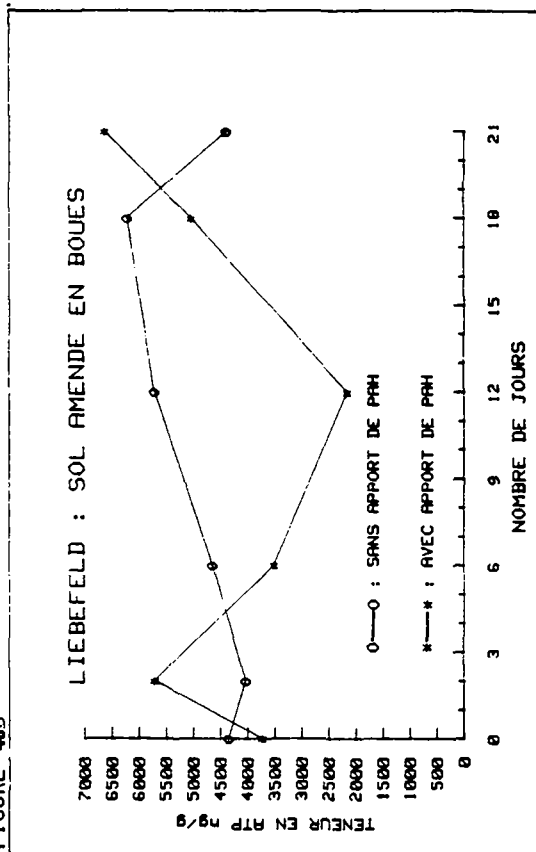


FIGURE 46C

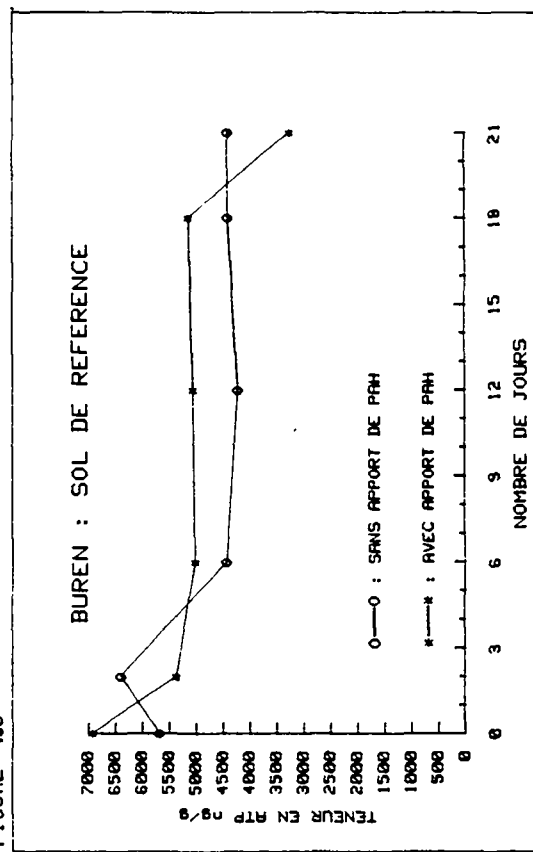
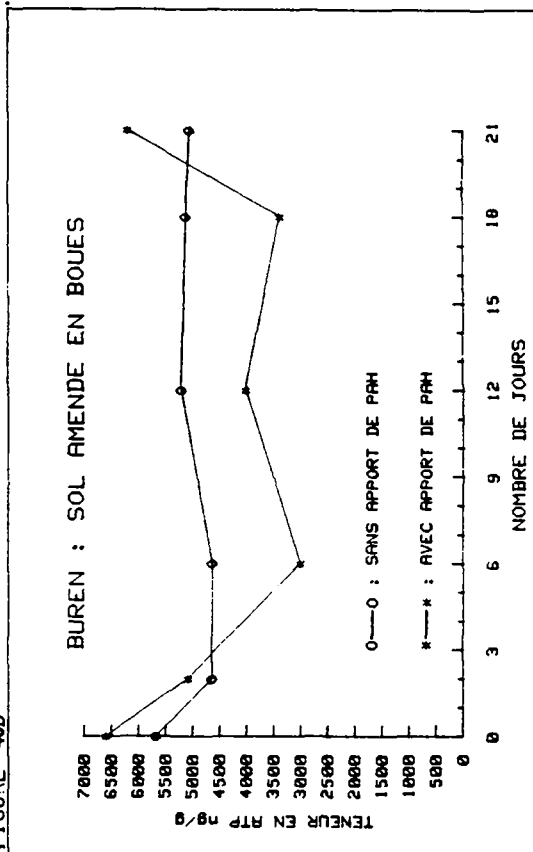


FIGURE 46D



EVOLUTION DE LA TENEUR EN AZOTE AMMONIACAL ( $\mu\text{g/g NH}_4^+ \text{ P.S.}$ )

FIGURE 47A

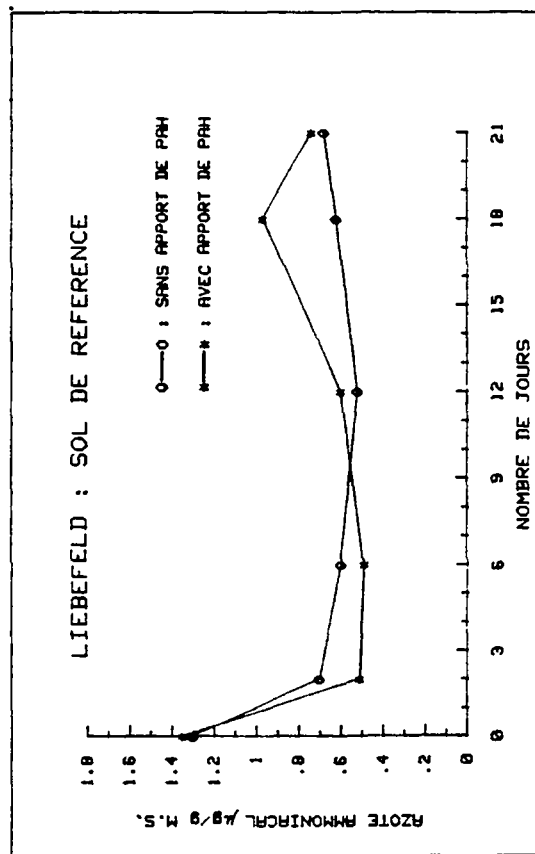


FIGURE 47B

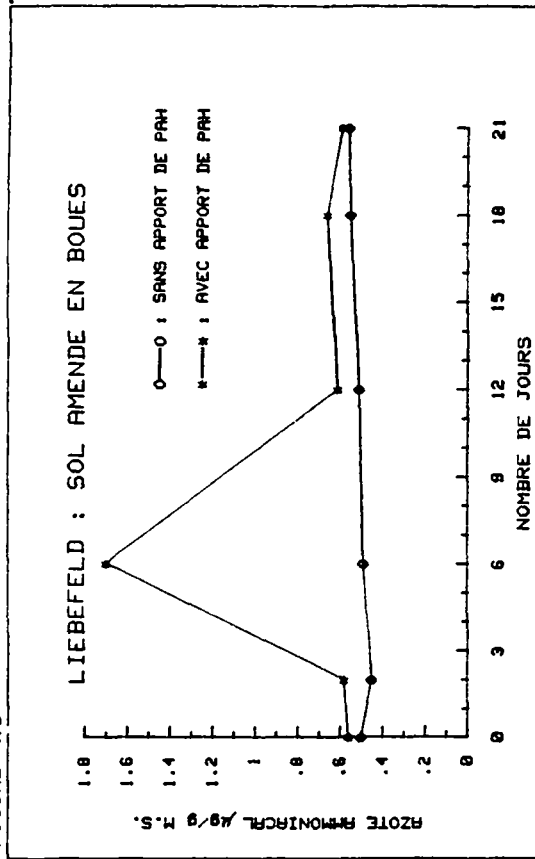


FIGURE 47C

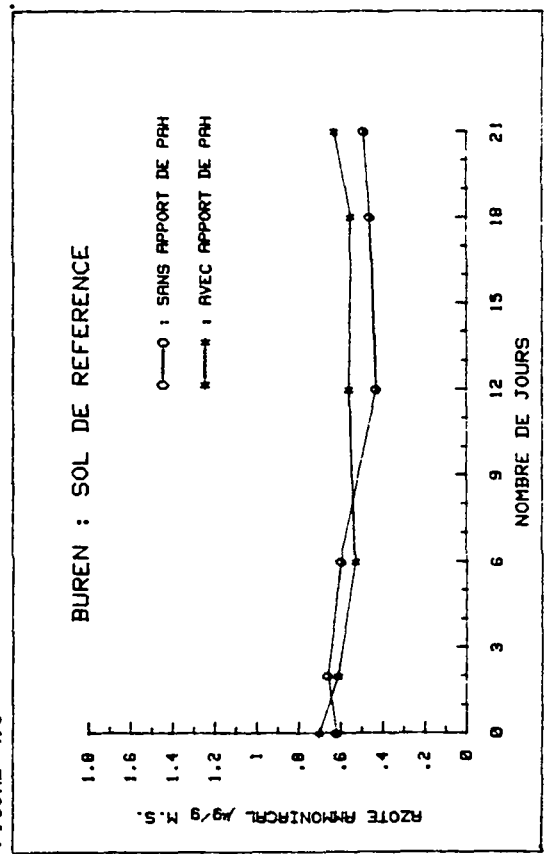
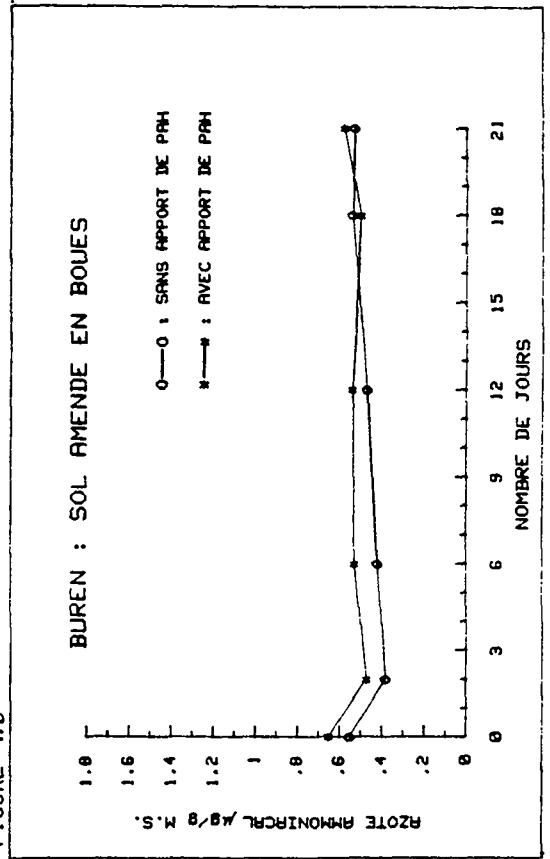


FIGURE 47D





EVOLUTION DE LA TENEUR EN AZOTE NITRIQUE ( $\mu\text{g/g NO}_3^-$  P.S.)

FIGURE 48A

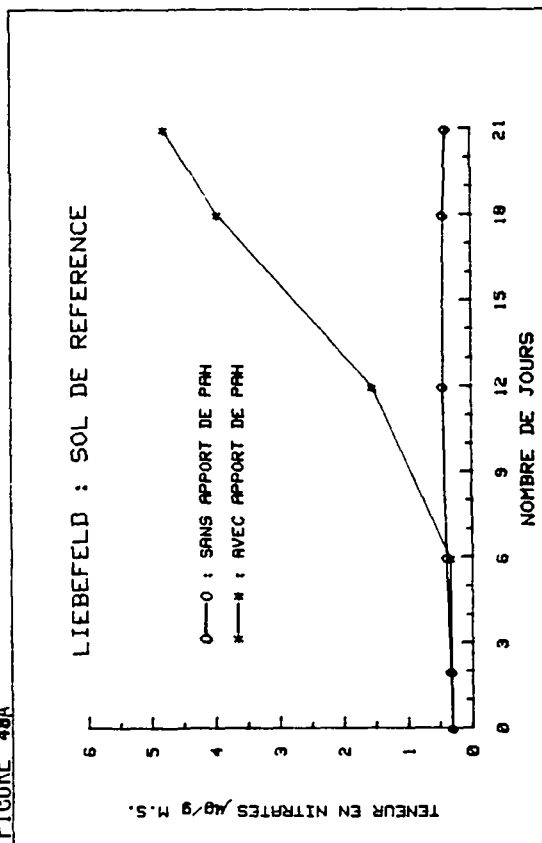


FIGURE 48B

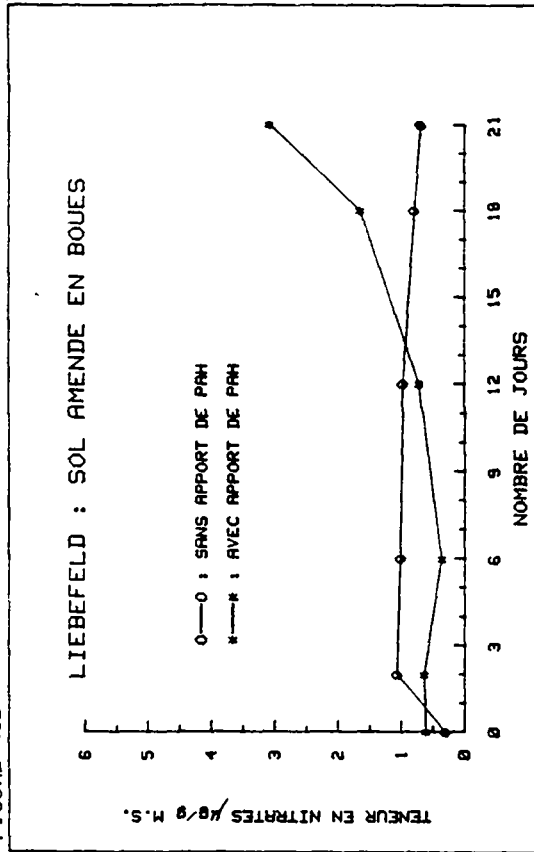


FIGURE 48C

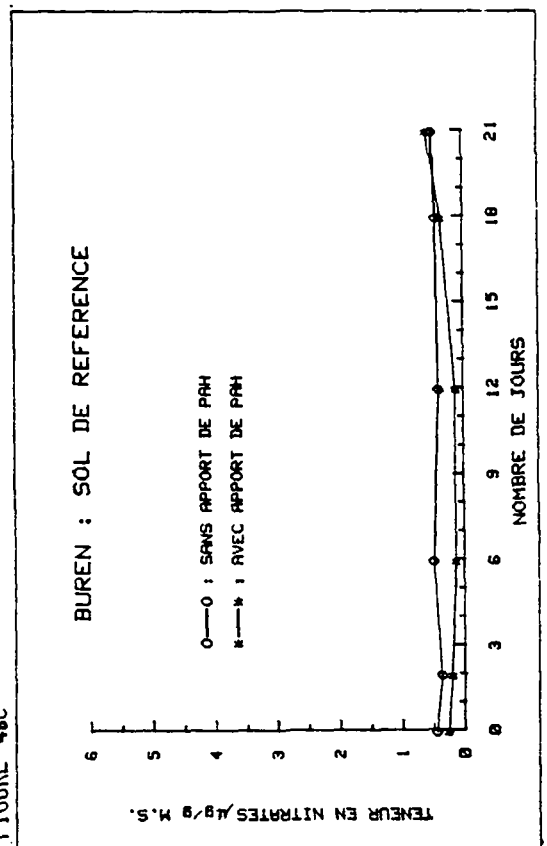
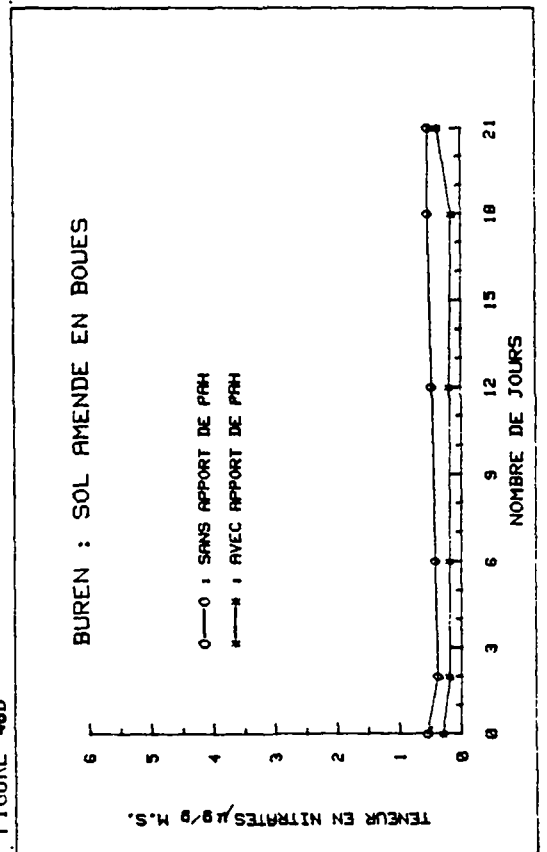


FIGURE 48D



EVOLUTION DE LA TENEUR EN PHENANTHRENE (PHE) DANS LES SOLS NON DOPES ET DOPES.

FIGURE 49A

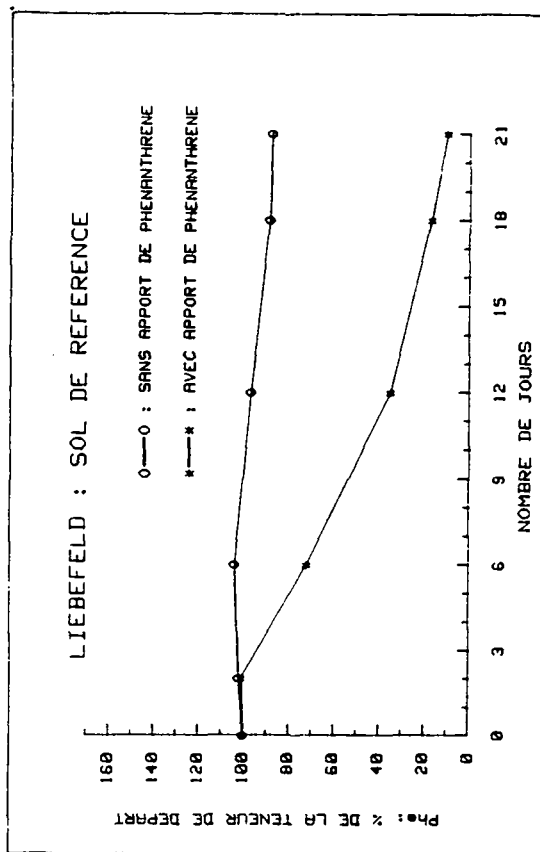


FIGURE 49B

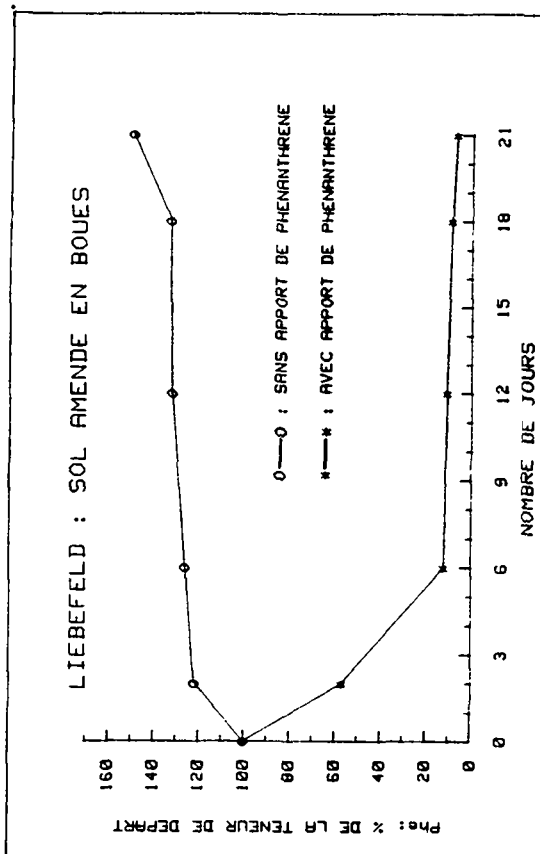


FIGURE 49C

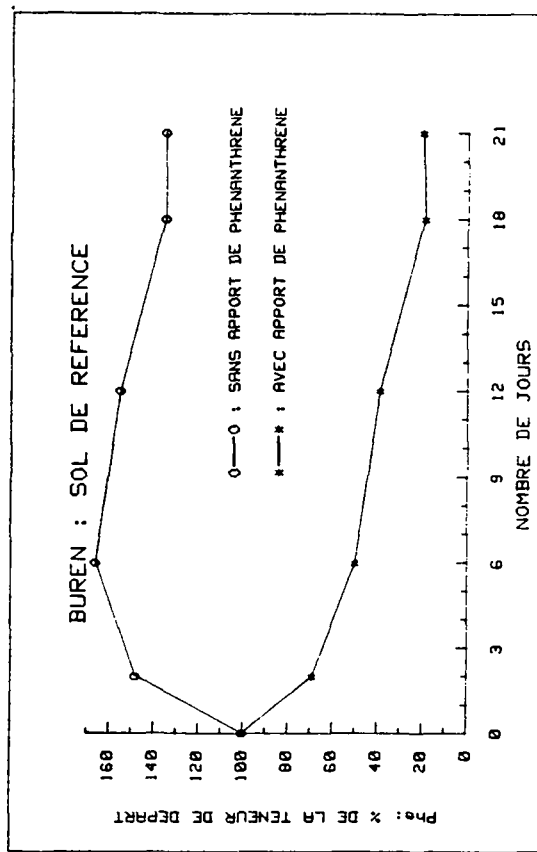
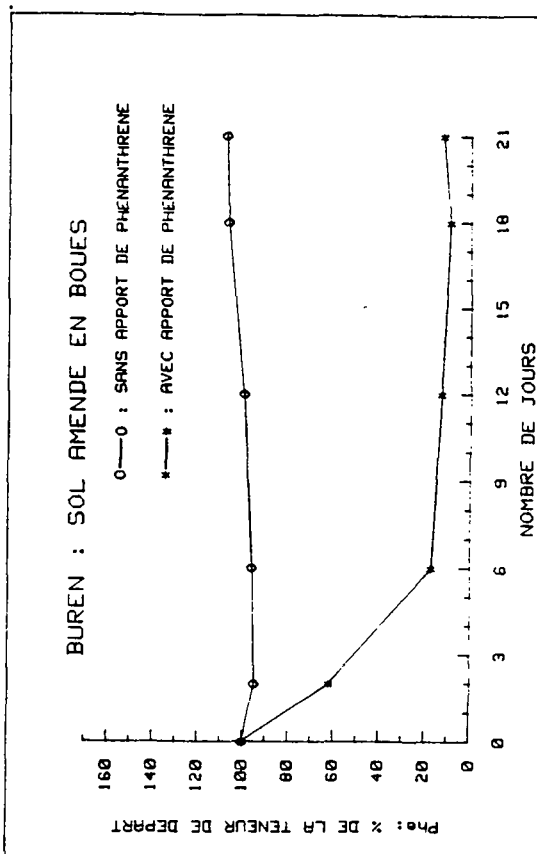


FIGURE 49D



d'une colonne "phase réverse C-18" comme dans notre cas, sépare un mélange complexe de PAH en fonction du degré d'aromaticité. Il reste cependant pratiquement insensible au degré d'alkylation des cycles [Wise et al. 1977]. Ainsi, le phénanthrène sur un chromatogramme HPLC représente en fait le *groupe phénanthrène* incluant les alkyl-phénanthrènes [Ewald et al. 1981]. Si nous désirons connaître avec la plus grande précision possible la cinétique de dégradation des PAH apportés sous forme pure (donc non méthylés) aux sols, l'HPLC ne peut être utilisé. La figure 50 montre un chromatogramme du "groupe phénanthrène" présent dans le sol de référence de Liebefeld. Les pics chromatographiques représentant les ions de valeur  $m/e = 178$  (phénanthrène), 192 (monométhylphénanthrènes), 206 (diméthyl-phénanthrènes ou éthyl-phénanthrènes) et 220 (triméthyl-phénanthrènes, méthyl-éthyl-phénanthrènes ou propylphénanthrènes) y sont représentés. Ce type de chromatogramme a été obtenu par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de masse (GCMS) au laboratoire de chimie bio-organique du Dr. Joan Albaigés (Barcelone, Espagne). On remarque que le phénanthrène pur ne représente que 23,4% des phénanthrènes totaux. Cette constatation est aussi valable pour les trois autres sols de cette recherche. Un certain nombre de chercheurs ont démontré que le rattachement de substituants alkyles sur les cycles aromatiques diminuent la tendance à la dégradation de ces cycles aromatiques. Cette observation a été faite dans des études "in vitro" [Fedorak et al. 1981, Solanas et al. 1984] et dans des études "in vivo" [Haines et al. 1982, Teal et al. 1978]. Or on observe que les courbes cinétiques du "groupe phénanthrène" des sols non dopés ne présentent précisément aucune tendance à la dégradation.

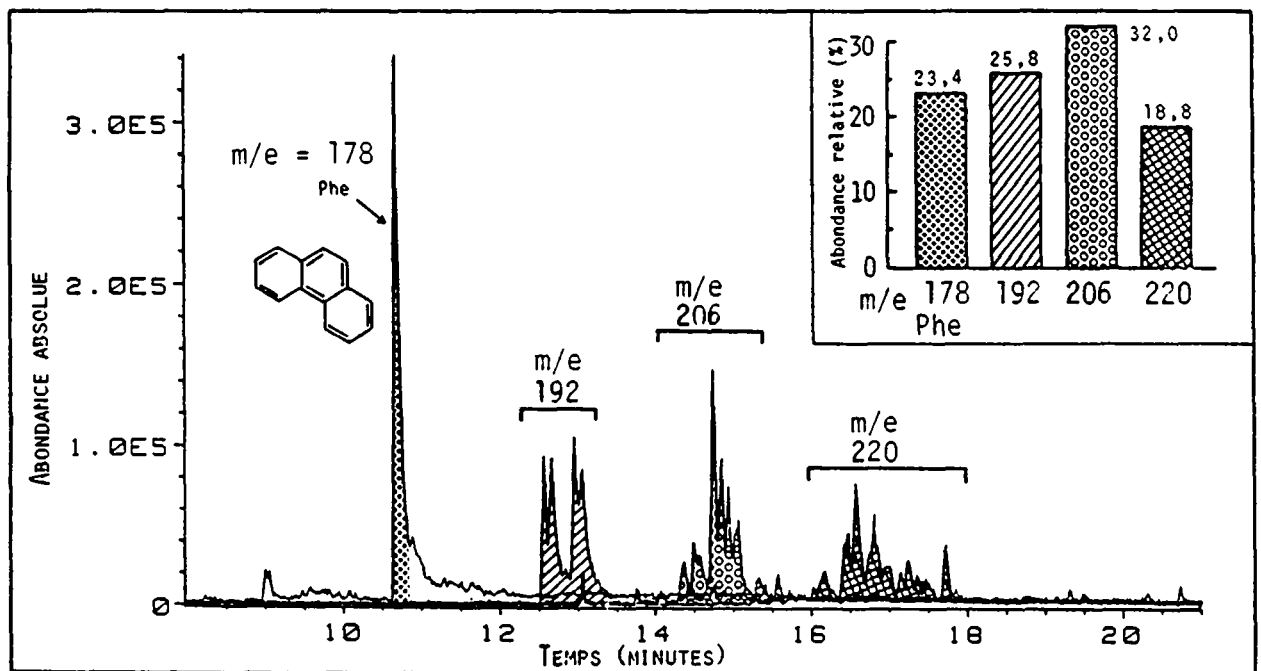


Figure 50: Chromatogramme du "groupe phénanthrène" et abondance relative des 4 groupes de phénanthrènes dans le sol de référence de Liebefeld.

Cette observation confirme donc la présence prédominante de phénanthrènes méthylés dans ces échantillons. En plus, par leur séjour prolongé dans les sols, les phénanthrènes pourraient être fortement adsorbés sur les constituants du sol et de ce fait mieux résister aux diverses formes de dégradations. Mais à ce jour ce ne sont que des suppositions.

Le pic phénanthrène sur un chromatogramme GC représente le phénanthrène pur. Les courbes cinétiques du phénanthrène des sols dopés montrent une disparition très rapide de ce phénanthrène: environ 90% de dégradation après 21 jours d'incubation. La dégradation est fortement accélérée par l'absence de substituants méthyles et probablement par l'absence des protections par adsorption mentionnées ci-dessus. Finalement, Sims (1983) a constaté que les vitesses initiales de dégradation des PAH dans les sols sont d'autant plus importantes que les concentrations de départ en ces micropolluants sont importantes. Or il ne faut pas perdre de vue que les sols dopés en PAH sont à peu près 10 à 100 fois plus contaminés par les 4 PAH sélectionnés que les sols non dopés.

Il apparaît donc que dans notre test d'incubation 3 facteurs ont contribué à ce que ce soient les PAH apportés aux sols qui se dégradent et non pas ceux qui étaient initialement présents dans les échantillons : l'absence probable de protections par des mécanismes physiques divers, l'absence de substituants méthyles sur les molécules de PAH ayant servis au dopages et une concentration initiale plus importante. De plus, les PAH apportés aux sols amendés en boues se sont dégradés encore plus rapidement que ceux apportés aux sols de référence. La raison en est probablement la présence d'une microflore plus abondante et mieux adaptée à la dégradation de telles molécules.

Cinétique de dégradation des 4 PAH, comportement des PAH servant au dopage dans les sols de référence et dans les sols amendés en boue d'épuration.

Les figures 51a, 51b, 52a, 52b, 53a, 53b et 54a, 54b comparent respectivement la dégradation du phénanthrène, du fluoranthène, du pyrène et du benzo(a)pyrène apportés à l'état pur, d'une part dans les sols de référence, et d'autre part dans les sols amendés en boues. La constatation globale est la suivante : à l'exception du B(a)P dans le sol de Liebefeld, c'est toujours dans le sol amendé en boues que les 4 PAH dopés se dégradent le plus rapidement. Cette constatation va dans le sens des courbes respirométriques du premier test d'incubation puisqu'une activité microbienne plus intense avait été constatée dans les sols amendés en boues que dans les sols de référence. Le tableau 20 compare les temps de demi-vie des 4 PAH étudiés en fonction du sol dans lequel ils ont séjourné. Une comparaison est faite avec les chiffres trouvés dans la littérature.

DEGRADATION DU PHENANTHRENE (Phe) ET DU FLUORANTHENE (Ft) DANS LES SOLS DOPES.

FIGURE 51A

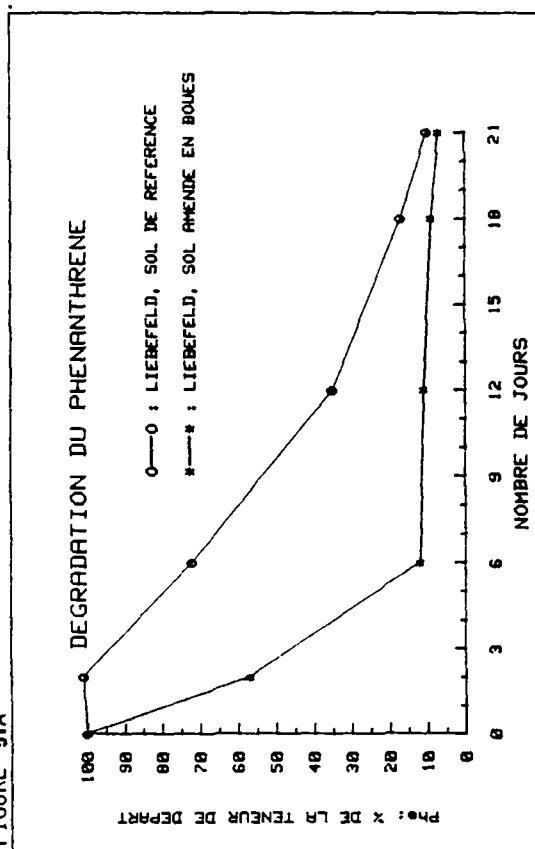


FIGURE 51B

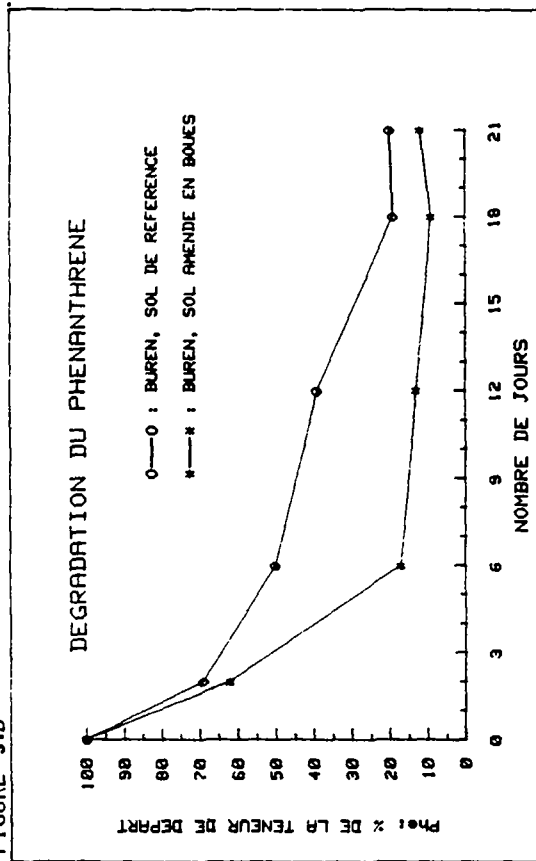


FIGURE 52A

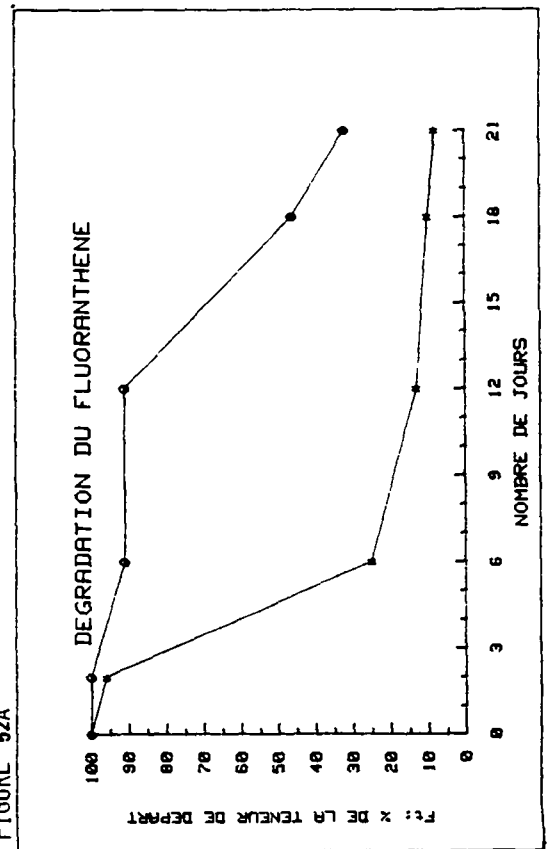
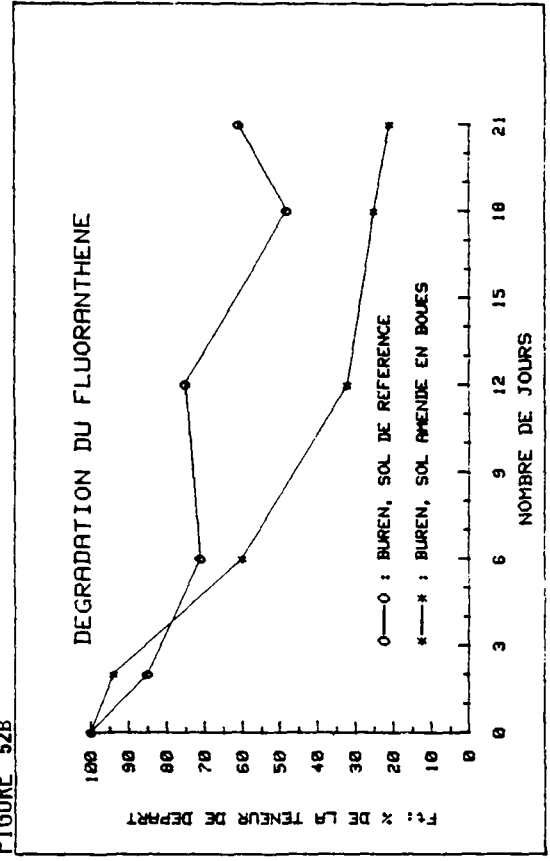


FIGURE 52B



DEGRADATION DU PYRENE (Pyr) ET DU BENZO(A)PYRENE (B(a)P) DANS LES SOLS DOPES.

FIGURE 53A

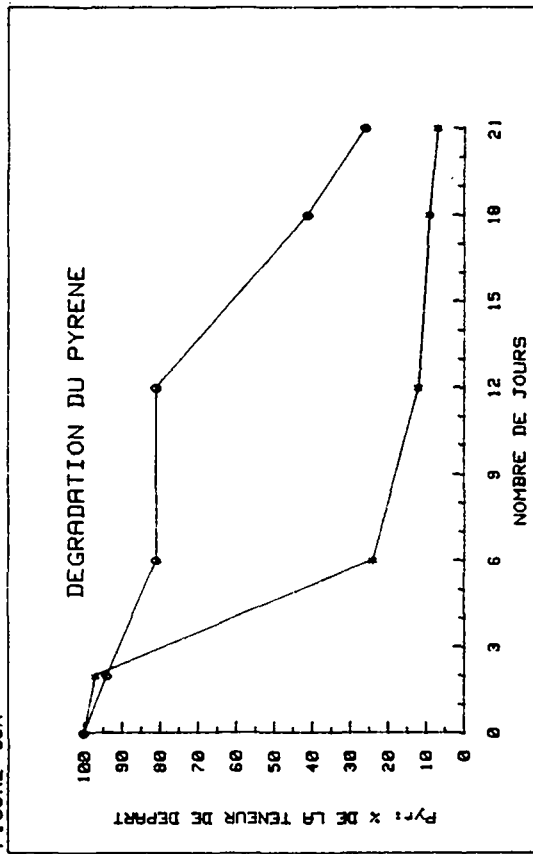


FIGURE 53B

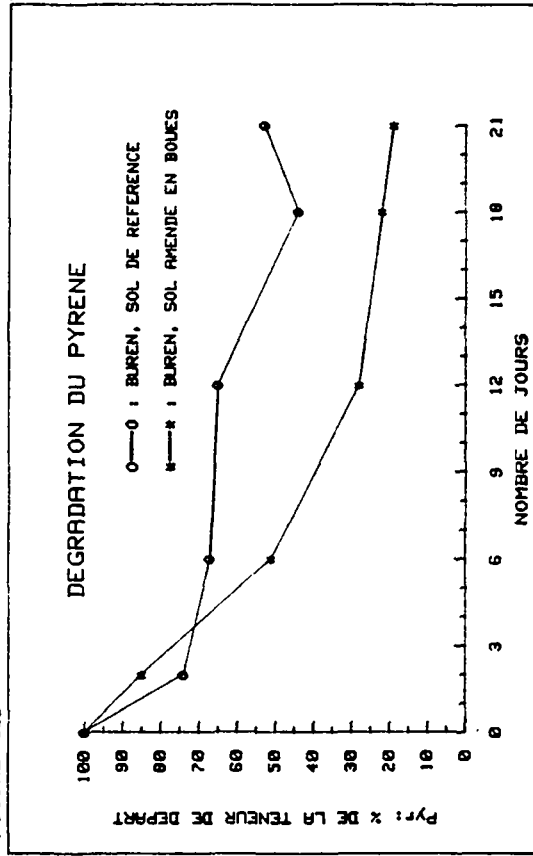


FIGURE 54A

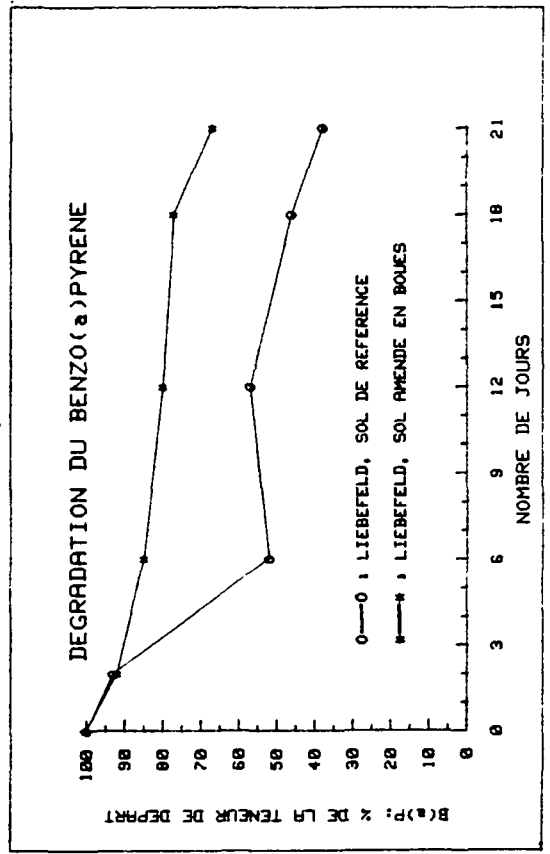


FIGURE 54B

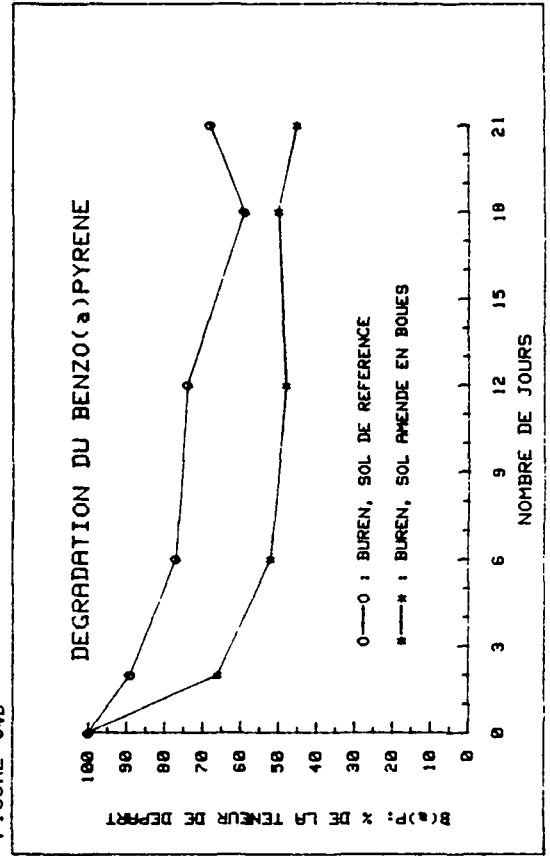


Tableau 20: Temps de demi-vie des 4 PAH étudiés et comparaison avec les chiffres de la littérature (unités = jours)

PAH	LR	LB	BR	BB	Bibliographie	T(*)	Référence
Phé	10	3	6	3	26	M	Groenewegen 1976
					9,7-14	M	Bulman 1985
Ft	17	5	20	9	44	M	Groenewegen 1976
					105-182	M	Gardner 1979
					34-39	M	Bulman 1985
Pyr	17	5	7	6	35	M	Groenewegen 1976
					48-58	M	Bulman 1985
B(a)P	16	>21	>21	18	37-406	B	Shabad 1969
					50-694	B	Herbes 1978
					7	M	Groenewegen 1976
					30-420	M	Gardner 1979
					218-347	M	Bulman 1985
					2-5	H	Shabad 1969
					60-420	M	Overcash 1984

T(\*) = Température à laquelle le temps de 1/2 vie a été mesuré  
 B = Basse température ( $T < 15^{\circ} \text{C}$ ), M = Température moyenne ( $15^{\circ} \text{C} < T < 25^{\circ} \text{C}$ ), H = Haute température ( $T > 25^{\circ} \text{C}$ ).

Les constatations que l'on peut faire de ce tableau sont les suivantes:

1. Le temps de 1/2 vie des PAH augmente dans les différents sols étudiés en fonction du nombre de cycles des PAH. C'est un phénomène bien connu et déjà mis en évidence par différents auteurs [Bulman et al. 1985, Sims 1983].

2. Le temps de 1/2 vie des PAH dans les sols amendés en boue d'épuration est chaque fois sensiblement inférieur par rapport à celui observé dans les sols de référence. Ce phénomène a aussi été mis en évidence pour des herbicides phénoxy [O'Connor et al. 1981]; il a été soit infirmé, soit confirmé en fonction d'un certain nombre de pesticides dans la recherche de Doyle (1978).

3. Les temps de 1/2 vie sont en général inférieurs dans cette recherche à ceux cités dans la littérature. Un facteur semblant jouer un rôle prépondérant dans ces temps de 1/2 vie, est la température. Or nous nous trouvons presque toujours à des températures d'incubation légèrement supérieures à celles trouvées dans la littérature.

4. Les différences de conditions expérimentales adoptées par chaque chercheur et les différents types de sol étudiés font qu'une très large gamme de temps de 1/2 vie est observée. Pour preuve on peut citer l'exemple du PAH le plus étudié, le benzo(a)pyrène. Les valeurs de 1/2 vie enregistrées sont comprises entre 7 et 694 jours, toutes conditions expérimentales confondues, mais en conservant toujours une totale obscurité durant les différentes expériences. Cette constatation nous amène à la conclusion que le temps de 1/2 vie n'est pas un paramètre fiable sur lequel on peut se baser dans les milieux terrestres, comme on peut le faire dans un milieu aquatique par exemple.

## 6. CONCLUSION DE CETTE PARTIE DE LA RECHERCHE

Si on considère l'ensemble des résultats obtenus dans nos deux tests d'incubation, il n'a jamais été mis en évidence que les grandes quantités de boues d'épuration apportées aux deux sols étudiés aient empêché une dégradation normale des PAH. Les PAH apportés sous forme pure sont d'ailleurs plus rapidement dégradés dans les sols ayant reçu de grandes quantités de boues d'épuration. Les fortes teneurs en PAH détectées dans les sols amendés en boues sont en fait le résultat de PAH moins dégradables (alkylés, adsorbés) qui ne sont pas encore entièrement dégradés lorsqu'une nouvelle quantité de boue d'épuration est apportée à ces sols.

La microflore du sol est très certainement altérée par l'épandage de boue d'épuration, mais pas dans un sens néfaste à la dégradation des PAH.

La constatation la plus intéressante de ces tests respirométriques est inattendue. Suite au dopage en PAH fait dans les 4 sols étudiés, le comportement de la microflore n'a pas présenté de différences dans un même type de sol entre le sol témoin et celui qui était amendé en boues. La différence apparaît entre les deux groupes de sol, sol argileux de Buren d'une part et sol sableux-limoneux de Liebefeld d'autre part. Ce dernier semble avoir le moins bien supporté le dopage en PAH. La nature du sol semble jouer un rôle déterminant dans l'impact que peut avoir un micropolluant organique sur les micro-organismes du sol. Il s'agira donc de tenir compte des différents types de sols dans les futurs tests et critères de toxicité de micropolluants organiques vis-à-vis des micro-organismes du sol.

## 7. CRITIQUE DES TESTS RESPIROMETRIQUES

Ces principaux résultats étant synthétisés, il nous a paru intéressant de faire une critique des tests respirométriques, en considérant les difficultés que nous avons eu à les réaliser.

En tout premier lieu et c'est peut être le point le plus important à signaler, les tests respirométriques n'ont aucune valeur absolue. Ces tests ne sont pas calibrés, tout comme la DL<sub>50</sub> (dose léthale pour 50% des individus) qui n'est pas non plus un test calibré. Les tests respirométriques n'ont de valeur que comparativement au sein de la même manipulation. Si deux tests respirométriques sont effectués selon un même protocole expérimental, avec le même équipement et sur deux échantillons de sol provenant exactement du même endroit, des courbes respirométriques très différentes peuvent être obtenues si les deux tests ne sont pas effectués en même temps !

Ainsi nous observons à la figure 55 que les courbes de minéralisation cumulées du sol de référence de Liebefeld ne sont pas du tout les mêmes dans le premier et le second test d'incubation. Les différences sont significativement différentes ( $\alpha=0,05$ ).



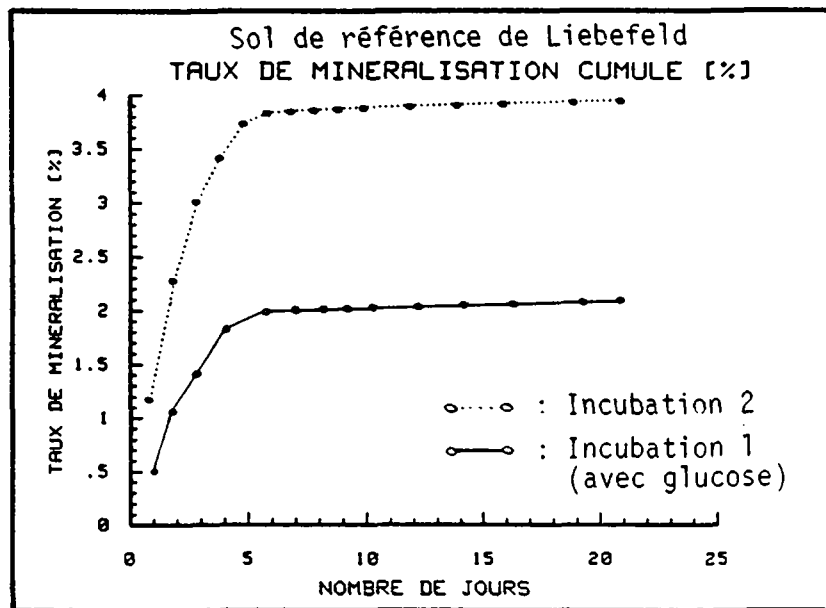


Figure 55: Comparaison des courbes de minéralisation cumulées du 1er et du 2ème test d'incubation.

Nous avons relevé un certain nombre d'autres points de critique que nous pouvons répartir en 2 groupes :

- Les critiques relatives au concept du test respirométrique.
- Les critiques relatives au protocole expérimental.

#### *Le concept du test respirométrique*

La question principale est de savoir si nous pouvons affirmer qu'une biotoxicité par un polluant a eu lieu en se basant sur des courbes de minéralisation de tests respirométriques. Nous avons mis en évidence que la présence de PAH inhibait la respiration des micro-organismes des 4 sols étudiés. Nous croyons cependant qu'il faut rester prudent face à cette observation et ne pas qualifier trop vite ce phénomène comme étant consécutif d'une biotoxicité.

En effet, nous avons constitué un tableau qui réunit quelques recherches ayant utilisé les tests respirométriques (Tableau 21). Le but de ce tableau n'est pas d'être exhaustif. Il compare les niveaux de dopage et les teneurs pour lesquelles une modification du dégagement de  $\text{CO}_2$  est observée, et ceci pour les "recherches micropolluants organiques" et pour les "recherches pesticides". Il apparaît de manière très nette qu'une modification du dégagement de  $\text{CO}_2$  par les micro-organismes du sol est souvent observée, quelle que soit l'importance du dopage du sol adopté. En effet, il n'y a que peu de différences entre les chiffres de la colonne "Dopage" et ceux de la colonne "Teneur dans le sol modifiant le dégagement de  $\text{CO}_2$ ". Cela voudrait dire que quelle que soit la nature de la substance ajoutée au sol, quel que soit le type de sol soumis aux incubations et surtout quelle que soit l'importance du dopage, on assiste souvent à une modification du

Tableau 21: Quelques recherches ayant utilisé les tests respirométriques.

GROUPE CHIMIQUE	NOM COURANT ou COMMERCIAL	DOPAGES kg/ha (*)	TENEUR DANS LE SOL MODIFIANT LE DEGAGEMENT DE CO <sub>2</sub> (Kg/ha) (**)	REFERENCE
A) Micropolluants org.				
Hydrocarbures polyaromatiques	PAH	0,2/0,5	0,2/0,5 (-)	Cette recherche
Phénols	Nonylphénol	10/100	100 (-)	Trocme 1985
B) Pesticides				
Dérivé de pyridine	Paraquat	1,25-100	1,25-100 (-)	Curl 1967
Dérivé d'acide benzoïque	Chlor- thiamide	10-20	non spécifié	Walter 1970
" " "	Dichlobenil	2,8-13	non spécifié	Walter 1970
" " "	Ioxynil	1,3/13/130	130 (-)	Van Schreven 1970
Acide aliphatique chloré	Dalapon	13/130/1300	130-1300 (-)	Van Schreven 1970
Phénoxy-alkanoate	Dichlorprop	2,5/25/250	2,5/25/250 (-)	Van schreven 1970
" " "	2,4-D	1,3	1,3 (+)	Schinner 1983
" " "	2,4,5-T	4,2	4,2 (+)	Schinner 1983
S-triazine	Atrazine	4 3-150	4 3-150 (-)	Husarova 1972 Simon 1971
"	Simazine	7 3-150 133	7 3-150 133 (+) (-) (-)	Schinner 1983 Simon 1971 March 1977
"	Prométhryne	3-150	3-150 (-)	Simon 1971
Phénylurée	Linuron	130	130 (-)	March 1977
"	Monuron	10	10 (-)	Doxtader 1968
Carbamate	Propoxur	2,5/12,5/125	2,5/12,5/125 (-)	Gupta 1975
Organochloré	Aldrin	0,1-100	1-100 (-)	Bardiya 1968
"	Dieldrin	0,1-100	1-100 (-)	Bardiya 1968
"	Lindane	0,1-100	1-100 (-)	Bardiya 1968

(\*) : X-Y : doses réparties entre X et Y kg/ha.  
X/Y : doses précises de X et Y kg/ha.

(\*\*) : (-) : indique une inhibition du dégagement de CO<sub>2</sub>.  
(+) : indique une stimulation du dégagement de CO<sub>2</sub>.

dégagement de CO<sub>2</sub> sans pour autant que cela traduise nécessairement un effet biotoxique. L'inhibition du dégagement de CO<sub>2</sub> par la contamination de nos 4 sols en PAH pourrait donc être due à un ou plusieurs facteurs qui n'ont rien à voir avec un effet biotoxique sur les microorganismes du sol. Aucune des recherches ayant utilisé les tests respirométriques n'a été en mesure de montrer concrètement à quoi ces modifications respirométriques étaient imputables.

Comme nous ne savons absolument pas sur quels types de micro-organismes les polluants agissent et qu'en plus, les tests respirométriques tels que nous les avons utilisés ne nous donnent que peu d'information sur ce que deviennent ces polluants, nous pensons que les tests respirométriques doivent être accompagnés d'autres tests permettant d'affiner les observations faites :

Au sujet du devenir des polluants organiques nous retenons principalement l'utilisation d'isotopes permettant le traçage de certaines substances. Soit c'est le polluant qu'on marque par l'utilisation d'isotopes radioactifs (<sup>14</sup>C) [Marinucci et al. 1979] ou non radioactifs (<sup>13</sup>C) du carbone, soit c'est le substrat qu'on marque au moyen d'azote 15. Une combinaison des deux types de marquage peut être utilisée [Nicolardot et al. 1986]. La seule façon pour faire une distinction entre le CO<sub>2</sub> provenant de la dégradation du polluant étudié et celui provenant de la dégradation des substances organiques courantes du sol, est de marquer le polluant à étudier au <sup>14</sup>C. Cette technique est appliquée par la majorité des chercheurs effectuant ce type d'études [Herbes et al. 1978., Herbes 1981, Lee et al. 1978, Mac Ray et al. 1967, Bulman et al. 1985, Scharpenseel et al. 1978]. Ce type de test peut cependant aussi mener à des conclusions erronées car une partie du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> formé peut être réincorporé à des molécules organiques du sol, empêchant ainsi leur piégeage dans la soude et provoquant une sous-estimation des résultats [Scheunert 1985].

Il est intéressant de noter au sujet du marquage des polluants que le <sup>14</sup>C est petit à petit abandonné au profit du <sup>13</sup>C. Il y aurait deux raisons à cela :

- le <sup>14</sup>C est un isotope radioactif qui induirait des effets toxiques supplémentaires à ceux du polluant lui-même.
- le <sup>14</sup>C est un émetteur de rayonnements β mous qui agit comme un fusil. Le noyau subit lors de l'émission du rayonnement un recul qui pourrait participer dans certains cas à la rupture de liaisons chimiques.

Le <sup>13</sup>C par contre est un isotope naturel (1,1% du carbone total) non radioactif dont la détection s'est fortement améliorée les dernières années suite à l'augmentation du pouvoir de résolution des spectromètres de masse.

Au sujet des types de micro-organismes sur lesquels les polluants agissent nous ne pouvons pas dire grand chose car il s'agit là de recherches qui sont encore à leur débuts. Nous pouvons néanmoins citer quelques exemples de recherche qui vont dans cette direction :

- L'analyse des acides aminés libres qui se modifient qualitativement et quantitativement avec la mortalité de certains types de micro-organismes.
- L'utilisation d'antibiotiques agissant sélectivement sur les champignons ou les bactéries.

Tout comme nous l'avons fait avec les techniques analytiques au chapitre 3, nous croyons qu'il est important de faire des recoupements d'observations provenant de techniques empiriques très différentes. Les tests respirométriques gardent toute leur validité à condition qu'ils soient accompagnés en parallèle d'autres tests, très différents dans leur conception, mais permettant des recoupements d'observations.

*Le protocole expérimental des tests respirométriques depuis le prélèvement des échantillons jusqu'à l'interprétation des résultats.*

#### Le prélèvement des échantillons.

La façon de prélever les échantillons de sol et de les stocker joue un rôle déterminant dans le bon fonctionnement des tests respirométriques. En fonction de la manière dont on a traité les échantillons de sol, on peut obtenir des courbes respirométriques très différentes.

La conservation affecte qualitativement le cortège des micro-organismes. Certains chercheurs sèchent leurs échantillons de sol jusqu'au moment de l'incubation [Guckert et al. 1970, Mitterer et al. 1981, Schinner et al. 1983], d'autres les sèchent partiellement avant de les stocker [Doyle et al. 1978], d'autres encore congèlent les sols. Pramer et Bartha (1972) affirment cependant que les sols doivent être traités comme s'il s'agissait de tissus vivants. Le séchage, le stockage prolongé, la congélation et le dégel sont autant de facteurs qui modifieront l'activité biochimique d'un sol, soit par inactivation des enzymes extracellulaires, soit en modifiant la densité des populations bactériennes. Cette affirmation a été confirmée par Lay et Ilnicki (1975) lorsqu'ils ont observé l'effet du stockage des sols sur la dégradation du propanil.

Chaussod et al. (1986) recommandent de conserver les échantillons de sol à leur humidité de prélèvement en aérobiose et au frais (4 à 10°C) si la durée de stockage ne dépasse pas quelques semaines. Pour une durée plus longue, la congélation peut éventuellement être acceptée mais le séchage est à proscrire.

Maintenir les échantillons de sol frais est une exigence difficile à respecter car un certain nombre d'analyses doivent être effectuées sur les sols à incuber juste avant le début des tests respirométriques. Elles prennent un certain temps (2 jours minimum pour une analyse de PAH), mais sont indispensables pour pouvoir démarrer l'incubation (carbone total, humidité etc...). On remarque donc qu'un certain temps de stockage est inévitable.

#### La durée du test respirométrique.

Nous avons observé une incompatibilité entre les études de toxicité des micropolluants organiques sur les micro-organismes du sol et l'utilisation des tests respirométriques. Cette incompatibilité se situe au niveau de la durée de ces tests.

Lorsqu'il ne s'agit pas d'un accident [Atwater 1984] ou d'un épandage de boue d'épuration, entraînant une pollution massive du sol sur une faible surface, on constate que les sols qui nous environnent s'enrichissent graduellement en micropolluants métalliques et organiques au cours du temps. Les tests de toxicité devraient être conçus de telle façon que l'on puisse régulièrement, et pendant un laps de temps assez long, apporter à un échantillon de sol de petites quantités d'un polluant dont on voudrait connaître la toxicité vis-à-vis des micro-organismes du sol. Seulement l'activité biologique d'un sol décroît avec le temps si on ne l'entretient pas et les micro-organismes se modifient qualitativement au cours du test. Il a été démontré par des études microbiennes que la production de  $\text{CO}_2$  et la consommation d'oxygène décroît graduellement lorsque des sols sont incubés dans des dispositifs de laboratoire, ce qui est précisément le cas des tests respirométriques [March et al. 1977, March et al. 1978].

Il est raisonnable de se poser la question si le fait d'apporter au sol à étudier tout le polluant en début d'expérience, comme effectué dans la grande majorité des tests respirométriques, a une signification écologique.

A notre avis la question de la durée des tests respirométriques nous font toucher du doigt leurs limites : des tests courts (quelques heures à 5 jours) n'ont qu'une signification écotoxicologique limitée tandis que les tests longs (40 jours et plus) amènent des modifications de paramètres que nous ne pouvons plus contrôler.

#### Le réglage du débit des gaz.

Une des grandes difficultés du test respirométrique à flux continu est de pouvoir régler le flux d'air dans les incubateurs avec grande précision. Une modification de ce flux d'air peut entraîner des perturbations dans les résultats du test respirométrique. D'une part, la volatilisation de la substance organique étudiée peut être modifiée car on sait qu'elle est fonction de la vitesse des gaz à travers l'air et le sol [Thibodeaux 1981]. D'autre part, une modification du flux d'air dans le système respirométrique influence la vitesse de décomposition de la matière organique. Parr et Reuszer (1962) ont mis en évidence qu'une augmentation du flux d'air augmente parallèlement, et de façon importante, le dégagement de  $\text{CO}_2$ .

Dans notre système d'incubation, on remarque que les bulles d'air passant à travers les pièges à soude ne sortent jamais avec un débit identique, et ce malgré le débit régulier de la bonbonne d'air et l'utilisation de vannes de précision. La difficulté d'obtenir des débits d'air reproductibles d'un test respirométrique à un autre constitue une des raisons pour laquelle les résultats de ces tests n'ont aucune valeur absolue.

#### L'interprétation des cinétiques de dégradation des substances étudiées.

Nous avons établi pour les différents sols à étudier des cinétiques de dégradation de 4 PAH (§5.2.4.). Certains auteurs attirent l'attention sur le fait que ces cinétiques de

dégradation peuvent être mal interprétées suite à une volatilisation d'une partie du polluant apporté au sol ou parce qu'une partie du polluant ne peut être extraite du sol [Watson 1977, Boyle 1980, Blades-Fillmore 1982]. Ce dernier point se vérifie presque toujours dans le cas des PAH.

Conclusion de la critique des tests respirométriques.

Nous avons essayé au cours de cette recherche d'observer l'impact d'une contamination de PAH sur l'activité minéralisatrice des micro-organismes du sol. Si des résultats ont été obtenus, il semble cependant qu'ils doivent être considérés avec grande prudence.

Il serait souhaitable dans les années à venir de pouvoir mettre au point de nouveaux tests, effectués en parallèle avec des tests respirométriques et possédant un ou plusieurs des avantages suivants :

- 1) Etre capables d'estimer aussi bien les toxicités chroniques qu'aiguës.
  - 2) Etre, du point de vue instrumental, aussi simples que possible, afin de ne pas rajouter à la complexité du sol le désavantage de paramètres expérimentaux peu contrôlables comme c'est le cas dans les tests respirométriques de longue durée.
  - 3) Etre sensibles à de très petites doses de polluants.
  - 4) Agir sur des intermédiaires de dégradation spécifiques des molécules organiques étudiées, tels que les enzymes [Rogers et al. 1985].
  - 5) Permettre de détecter des modifications qualitatives des micro-organismes.
-

## **CHAPITRE 5**

### **Etude du transfert des hydrocarbures polycycliques aromatiques des sols vers les tissus des lombriciens.**

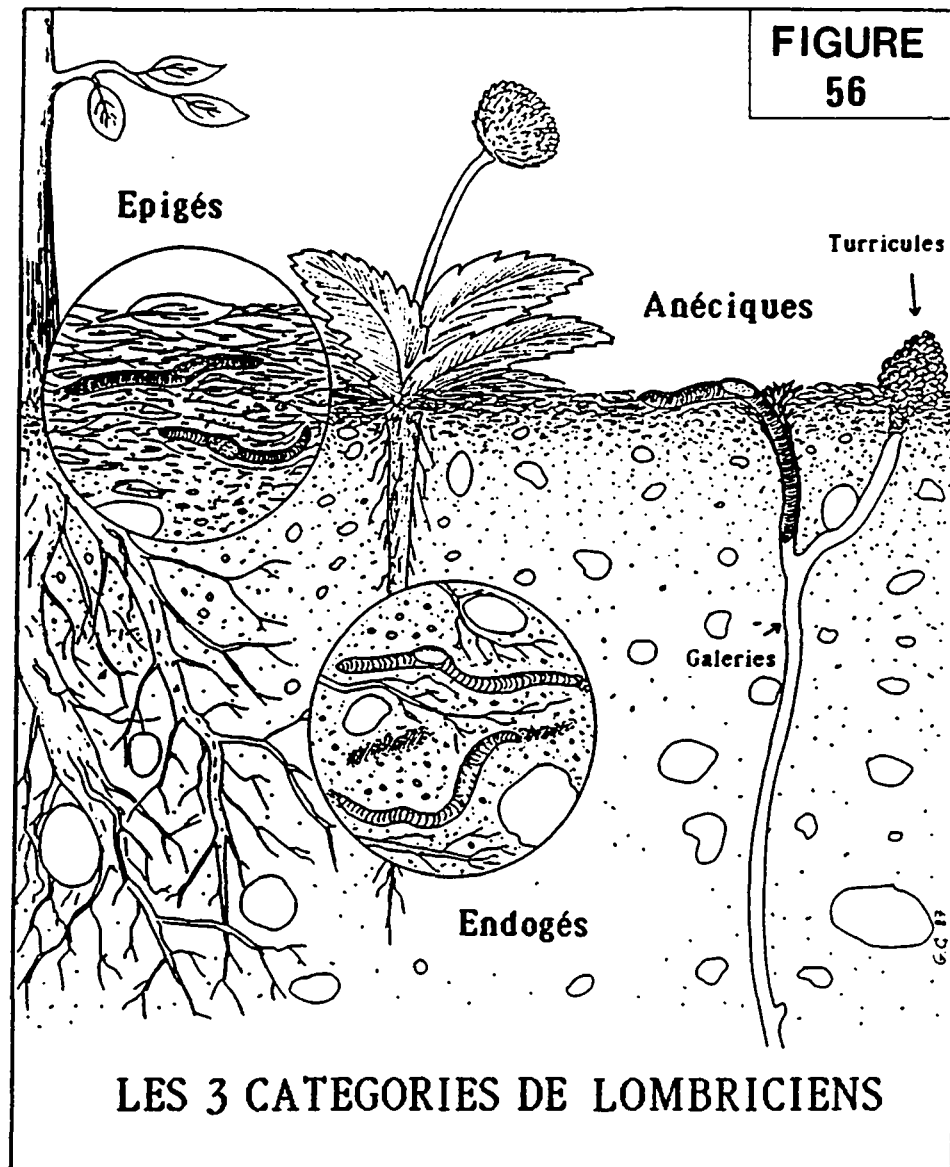
*Ce chapitre montrera que les recherches étudiant l'influence de substances organiques toxiques sur les lombriciens sont difficilement comparables. Trop de facteurs les séparent tels que les types de sol et les conditions expérimentales. Jusqu'en 1975 environ l'opinion des chercheurs était que les micropolluants des tissus des lombriciens augmentent linéairement en fonction de la teneur de ces produits dans le sol. Avec l'affinement des techniques analytiques des dernières années on s'aperçoit que le comportement des micropolluants dans les tissus des lombriciens est bien plus subtil. Le concept d'accumulation des polluants dans les tissus des lombriciens restant difficile à prouver, ce chapitre montrera que des modifications de proportions de familles de substances organiques s'y opèrent par rapport à celles du sol dans lequel les lombriciens vivent.*

#### **1. LES 3 CATEGORIES DE LOMBRICIENS**

Les lombriciens, plus connus sous le nom de vers de terre suscitent en général la répugnance du public. Ils sont souvent considérés comme étant des animaux primitifs ou inférieurs. C'est probablement la raison pour laquelle presque aucune recherche scientifique ne leur a été consacrée jusque dans les années 60. Or pour peu que le sol étudié soit légèrement humide, chacun peut vérifier leur présence dans chaque bêche de terre, que ce soit en forêt, dans une prairie, un jardin ou un champ. Ils sont en fait omniprésents. Ils ont une fonction essentielle d'aération et de structuration des sols et contribuent fortement à la fertilité des milieux. Quelques chiffres vont servir à nous fixer les idées quant à leur importance écologique [Bouché 1984]:

- Ils représentent la première biomasse animale sur terre.
- Une tonne de vers de terre ingère par hectare environ 250 tonnes de sol par an.
- Sur une surface d'un hectare, les vers de terre creusent 4000 à 5000 Km de galeries.

On peut classer les lombriciens en trois grands groupes écologiques qui reflètent des adaptations aux différentes contraintes et nécessités vitales, trophiques principalement. Ces trois groupes sont décrits par Cuendet (1984). Nous avons décidé de reprendre ce texte tel quel, pensant qu'il est impossible pour un non-spécialiste de mieux caractériser ces 3 grands groupes. Pour suivre son explication nous nous aiderons de la figure 56.



-Les épigés, de petite taille, se nourrissent de la litière et vivent dans celle-ci ou très près de la surface du sol. Ils payent un lourd tribut aux prédateurs et à la sécheresse.

-Les endogés, généralement de taille moyenne, consomment la matière organique dispersée dans la partie minérale du sol et creusent des galeries subhorizontales;

-Les anéciques, de grande taille, viennent se nourrir des déchets végétaux en surface et creusent de profondes galeries verticales.

La présence quasi générale des lombriciens dans les sols fait que ces animaux sont parmi les premiers à entrer en contact avec toutes les formes de pollution qui harcellent les écosystèmes terrestres. Le traitement abusif des cultures par les produits phytosanitaires, les polluants organiques apportés par



les précipitations sèches et humides, les décharges licites ou non de produits chimiques forment un ensemble de pressions de pollution sur les populations lombriciennes. A plus ou moins brève échéance les contaminants organiques ou métalliques peuvent avoir deux conséquences importantes sur les lombriciens:

Ils peuvent causer une disparition partielle ou totale des lombriciens, entraînant indirectement une diminution de la fertilité des sols contaminés.

Ils peuvent s'accumuler dans les tissus des lombriciens. Les vers contaminés présentent dès ce moment un risque pour les échelons supérieurs du réseau trophique. On sait par exemple que le ver de terre constitue la base de l'alimentation de certains oiseaux tel que la mouette rieuse [Cuendet, 1979].

## 2. LA LITTÉRATURE SCIENTIFIQUE.

Les principales catégories de lombriciens étant définies, il convient à présent d'établir une synthèse des principales recherches étudiant l'influence de substances organiques toxiques sur ces animaux.

Du point de vue bibliographique on distingue 3 groupes parmi toutes les recherches étudiant l'influence de substances organiques toxiques sur les lombriciens.

Le premier groupe étudie l'impact de pesticides sur les peuplements lombriciens. Les résultats obtenus sont surtout destinés à établir les doses d'épandages à adopter. [Boykins 1966; Edwards 1973; Tomlin et al. 1974; Van Rhee 1977].

Le second groupe vise à réaliser des tests de toxicité de polluants organiques sur les écosystèmes terrestres. [Edwards 1979; Neuhauser 1985].

Le troisième groupe de recherche est celui qui nous intéresse tout particulièrement. Il est consacré à l'étude plus fine de la pénétration de substances organiques toxiques dans les tissus des lombriciens. [Beyer et al. 1980; Davis 1968 et 1971; Davis et al. 1966 et 1969; Diercxsens et al. 1985; Edwards 1973; Gish 1970; Kreis et al. 1987; Lord 1980; Reinecke et al. 1984; Wheatley 1968; Yadav et al. 1976 etc...]. Trois recherches ont retenu notre attention. Elles soulignent le fait que les lombriciens accumulent les micropolluants organiques [Kreis et al. 1987] et les pesticides [Davis 1971, Lord 1980] de façon différente en fonction des catégories de vers de terre ou de leurs habitudes alimentaires. Il ressort de ces recherches que les catégories de lombriciens entrant en contact avec la couche superficielle du sol sont plus contaminés en micropolluants organiques que celles vivant et se nourrissant en profondeur (principalement les vers endogés). En effet, nous avons vu au chapitre 3, §8, que les micropolluants organiques ont une forte tendance à s'accumuler dans les premiers centimètres de la couche superficielle du sol. Kreis et al. (1987) concluent que ce sont les lombriciens de la classe anécique, tel que les *Nicodrilus sp. adulte* qui sont les plus à même de servir d'indicateurs de la pollution des sols par les PCB. Cette classe de lombriciens vit en profondeur mais se nourrit de débris organiques qui s'accumulent en surface du sol.

### 3. LE BUT DE CETTE PARTIE DE LA RECHERCHE.

Le but de ce chapitre sera de démontrer au moyen de données de la littérature et de recoupements expérimentaux que les lombriciens ont un comportement dynamique face aux micropolluants organiques présents dans les sols. Nous essayerons de montrer que les tissus des lombriciens peuvent contenir des proportions de polluants différentes de celles détectées dans le sol dans lequel ils vivent.

### 4. L'ACCUMULATION DE MICROPOLLUANTS ORGANIQUES DANS LES TISSUS DES LOMBRICIENS.

Nous savons à ce stade-ci que certaines catégories de lombriciens seraient susceptibles d'accumuler des substances organiques toxiques dans leur tissus. Est-ce réellement le cas ? Nous allons essayer d'y voir plus clair dans ce chapitre.

#### 4.1. Difficultés de comparaison de différentes recherches.

Le problème de l'accumulation des substances organiques toxiques dans les tissus de lombriciens est un sujet controversé et qui n'est pas encore résolu à ce jour. Ce problème résulte principalement dans le manque de valeurs de comparaison entre les différentes recherches traitant ce sujet. Trois raisons y contribuent:

La première, principalement discutée par Davis (1971), est que les caractéristiques du sol affectent grandement la disponibilité des pesticides et des micropolluants organiques dans les sols. Pour des sols différents mais présentant un même taux de contamination en substance organique toxique, on risque d'observer un comportement accumulatif différent de cette substance dans les tissus des lombriciens.

La seconde est liée aux unités dans lesquelles sont exprimés les résultats analytiques. La plupart des recherches étudiant la pénétration de micropolluants organiques dans les tissus des lombriciens cherchent à établir un *facteur de concentration* FC:

$$FC = \frac{\text{Concentration du polluant dans les lombriciens}}{\text{Concentration du polluant dans le sol}}$$

Toutes les recherches expriment la concentration du polluant dans le sol par rapport au poids sec de sol. Certaines recherches expriment aussi la concentration du polluant dans les lombriciens par rapport au poids sec [Beyer et al. 1980; Gish 1970; Kreis et al. 1987; Marquenie 1984]; d'autres par contre l'expriment par rapport au poids frais de lombriciens [Boykins 1966, Davis 1968, Diercxsens et al. 1985; Hunt et al. 1969; Reinecke et al. 1984; Stringer et al. 1964; Wheatley et al. 1968]. Le seul à discuter de ce problème est Davis (1971). Il affirme, et c'est aussi notre opinion, que l'option "poids sec/poids sec" est plus exacte lorsqu'on désire effectuer des comparaisons entre différentes espèces de lombriciens, car chaque espèce possède son propre taux d'humidité. En revanche, cette option exprime souvent un facteur

de concentration supérieur à 1 ou proche de cette valeur, ce qui fausse certainement l'idée d'accumulation. Cette constatation est clairement visualisée sur la figure 57.

A ces commentaires nous ajouterons qu'une autre façon de voir si localement une bioaccumulation d'un polluant a lieu dans les tissus des lombriciens, est de calculer le facteur de concentration FC en exprimant les concentrations par rapport au volume frais de lombriciens et au volume frais de sol.

La troisième raison est que d'une recherche à une autre les conditions dans lesquelles sont analysés les sols et les lombriciens varient fortement. Par exemple, si on réunit dans un même tableau les facteurs de concentration obtenus et les principales conditions expérimentales pour la présente recherche (chapitre 5.2.), les recherches d'Edwards et al. (1985), et Marquenie et al. (1984), nous obtenons les valeurs du tableau 22:

Tableau 22: Comparaison des facteurs de concentration vers/sol (P.S./P.S.) de 3 recherches.

PAH	La présente recherche	Edwards et al. 1985	Marquenie et al 1984 (*)
Phé	0,34 à 0,60	19 à 65	-
An	0,30 à 0,63	-	0,10 à 0,25
Ft	0,37 à 0,54	6,4 à 34	-
Pyr	0,43 à 1,23	-	0,05 à 0,10
B(a)A	0,77 à 1,45	-	0,02 à 1,00
B(k)F	0,25 à 0,45	0,3 à 1,5	-
B(a)P	0,41 à 0,48	0,3 à 3,0	0,20 à 1,00
BP	0,40 à 0,44	0,6 à 4,0	-
Conditions expérimentales	lyophilisation vers vidés vers non triés	séchage à 105° C vers vidés vers triés	pas de séchage vers pleins vers triés

\* : Le poids sec des lombriciens concernant cette recherche a été déterminé au moyen d'un lot qui ne fût pas pris en compte pour l'analyse.

On observe des facteurs de concentration très variables entre les 3 recherches.

La très grande variabilité dans les types de sol, les unités dans lesquelles sont exprimés les résultats, ainsi que les conditions expérimentales qui diffèrent d'une recherche à une autre, sont trois facteurs qui empêchent de dire si globalement les lombriciens bioaccumulent les micropolluants organiques dans leur tissus.

#### 4.2. La théorie statique et la théorie dynamique.

Malgré les 3 difficultés mentionnées dans le chapitre précédent, nous allons tout de même essayer de voir quelle relation il y a entre les micropolluants organiques contenus dans les tissus des lombriciens et dans le sol dans lequel ils vivent. En examinant la littérature on remarque qu'à ce sujet deux écoles s'affrontent:

La première école préconise une théorie statique.

Elle affirme que les teneurs en pesticides ou en micropolluants des tissus des lombriciens augmente linéairement en fonction de la teneur de ces produits dans le sol. L'ensemble des résultats soutenant cette théorie a été rapporté sous forme de figure par Edwards et al. (1973). Nous avons repris cette figure telle quelle (Figure 57). Après avoir examiné une par une les différentes recherches considérées par Edwards et al. (1973), nous avons remarqué qu'aucune d'elle ne séparait les tissus des vers du contenu de leur tube digestif. Il paraît logique qu'à ce moment-là une tendance linéaire entre les concentrations des polluants des sols et des vers puisse être observée.

A la décharge de la théorie statique, il faut souligner qu'elle est composée de recherches déjà assez anciennes qui ne disposaient pas à l'époque de la fiabilité et de la précision analytique actuelle.

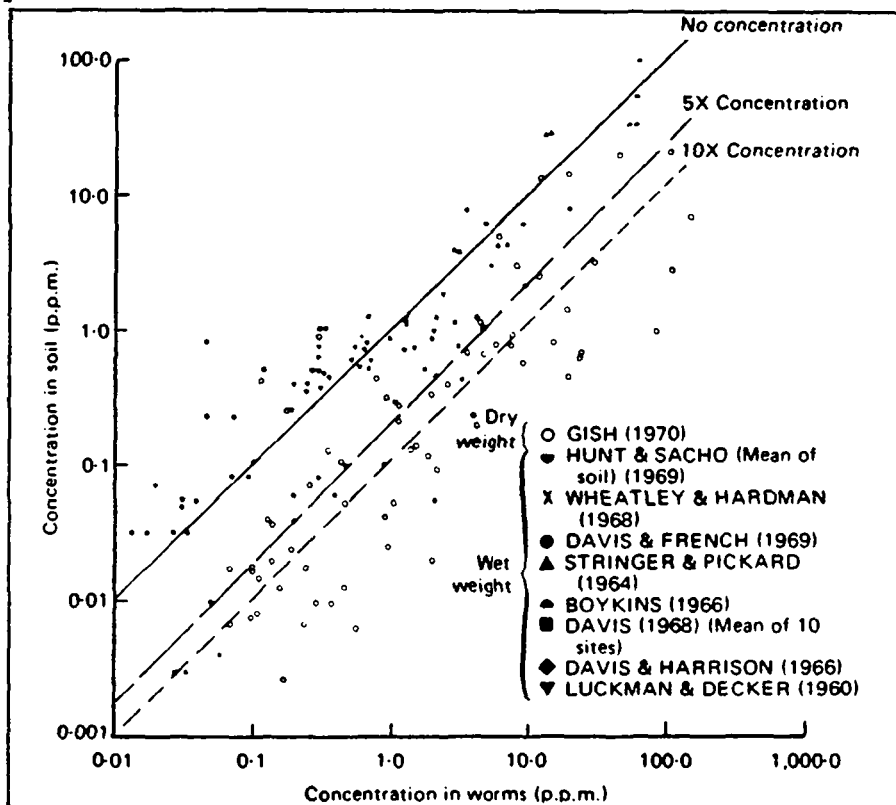


Figure 57: Transfert de résidus organochlorés des sols vers les lombriciens. Théorie statique proposée par Edwards (1973).

La seconde école soutient une théorie dynamique.

Elle a été soutenue pour la première fois par Wheatley et al. (1968). Ils établirent une équation de type logarithmique entre la concentration des résidus organochlorés dans le sol (S) et dans les vers (W) :  $\log(W) = 0,268 + (0,798 \pm 0,072) \log(S)$ . De cette équation il ressort qu'il y a proportionnellement moins de pesticides concentrés dans les vers provenant de sols fortement chargés en pesticides que dans ceux provenant de sols qui en sont faiblement chargés.

Quelques recherches plus récentes [De Weck et al. 1981, Diercxsens et al. 1985, Reinecke et al. 1984] vont dans cette même direction. Nous avons observé une nette augmentation de l'accumulation de [PCB dans les tissus des vers en fonction de l'augmentation de la contamination du sol (Barres A et C sur la figure 58). Nous avons à ce moment-là postulé que les lombriciens accumuleraient les PCB à partir d'un certain niveau de contamination du sol. La contamination du sol la plus élevée en PCB que nous avons eu à étudier était de  $110 \mu\text{g/Kg P.S.}$ . C'est à peu près à ce même niveau de contamination du sol ( $50 \mu\text{g/Kg P.S.}$ ) que Reinecke et al. (1984) observent le plus fort taux d'accumulation de 2,3,7,8 TCDD (Dioxine) dans les tissus des lombriciens. Une diminution du taux d'accumulation de la dioxine est observée au fur et à mesure que la teneur en dioxine augmente au-delà de  $50 \mu\text{g/Kg P.S.}$ .

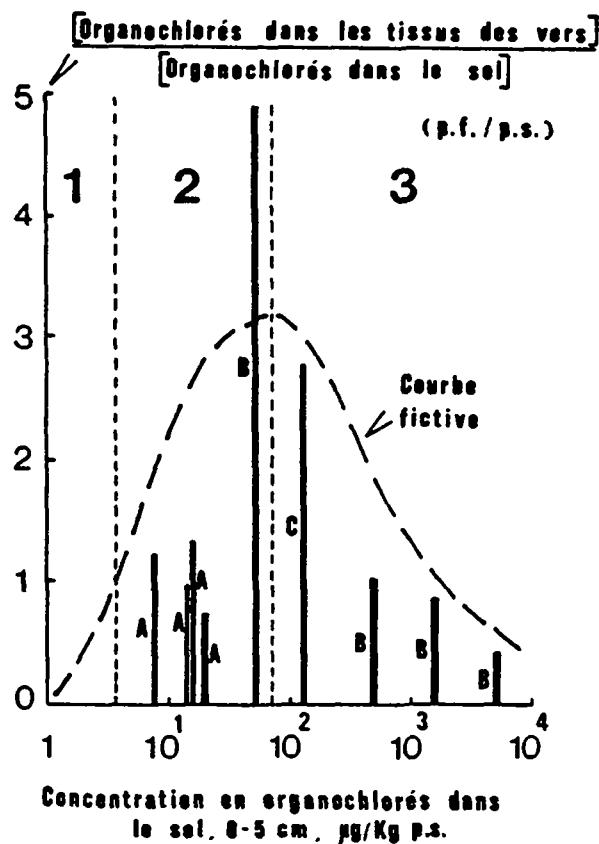


Figure 58 : Courbe d'accumulation dynamique de micro-polluants organiques dans les tissus des lombriciens.  
A : De Weck et al. (1981), B : Reinecke et al. (1984),  
C : Diercxsens et al. (1985).

Nous nous sommes permis de grouper nos résultats avec ceux de Reinecke et al. (1984) et de les illustrer sur la figure 58; ceci pour trois raisons :

Premièrement, les propriétés physico-chimiques et le comportement dans les sols du PCB et du 2,3,7,8 TCDD sont voisins. Ce sont tous les deux des hydrocarbures chlorés à deux cycles benzéniques, très hydrophobes.

Deuxièmement, les trois recherches expriment les résultats en terme de poids sec de sol et de poids frais de vers.

Troisièmement, les trois recherches vident le contenu du tube digestif des vers avant l'analyse des tissus. Ce dernier point est une innovation par rapport à toutes les recherches précédentes. Une technique de nettoyage du tube digestif des lombriciens a été mise au point dans notre laboratoire au moyen de poudre de silice afin d'étudier le comportement des PCB dans leurs tissus [Tarradellas et al., 1982].

Tout en sachant bien que de tels rapprochements entre deux recherches sont dangereux (polluants, sols, conditions expérimentales et techniques analytiques différents), le peu de résultats disponibles sur l'accumulation de polluants dans les tissus des lombriciens nous y incite.

La figure 58 nous montre une courbe d'accumulation fictive des micropolluants dans les tissus des lombriciens. Elle est subdivisée en 3 parties :

- 1) Zone "non-accumulative" due aux trop faibles concentrations en micropolluants organiques dans les sols.
- 2) Zone "accumulative", les lombriciens accumuleraient les micropolluants dans leurs tissus à partir d'un certain seuil de contamination des sols ( $\pm 5 \mu\text{g/Kg P.S.}$ )
- 3) Zone de "régulation active" du lombricien, où celui-ci empêcherait une pénétration de substance organique toxique dans ses tissus au dessus d'un certain seuil.

Reinecke et al. (1984) émet l'hypothèse qu'à partir d'un certain niveau de contamination du sol en 2,3,7,8-TCDD ( $\pm 50 \mu\text{g/Kg P.S.}$ ), la teneur en ce polluant dans les tissus des lombriciens est maintenue sous une limite de concentration ( $\pm 400 \mu\text{g/Kg P.F.}$ ) par un mécanisme d'excrétion active propre aux lombriciens.

Cette hypothèse nous a séduit et convaincu pour trois raisons:

La première est que les résultats que nous avons obtenus sur l'accumulation des PCB dans les tissus des lombriciens s'insèrent assez bien dans cette théorie (Figure 58).

La seconde est qu'on peut difficilement se faire une idée de l'accumulation des micropolluants organiques dans les tissus des lombriciens en effectuant l'analyse du ver avec le contenu de son tube digestif, comme c'était le cas de toutes les recherches à tendance statique d'avant 1980.

La troisième est qu'il ne faut jamais perdre de vue que les lombriciens sont des êtres vivants, possédant leur propre dynamique et réagissant de façon certainement active face à une pression de polluants. La théorie statique est trop simpliste à nos yeux, elle réduit le ver de terre à un simple "tuyau" présent dans le sol, absorbant simplement les polluants qui s'y trouvent.

Pour nous convaincre de cet aspect dynamique du lombricien, Rouelle (1982) et Reinecke et al. (1984) nous signalent que les déjections des lombriciens peuvent contenir davantage de micro-organismes que ceux contenus dans le sol environnant (jusqu'à 60% en plus). Ils ne semblent cependant pas différer qualitativement par rapport à ceux-ci. De plus le lombricien peut établir un choix alimentaire dans le milieu où il vit [Ferrière 1980; Rouelle 1982]. Ces deux aspects indiquent qu'il est raisonnable de penser que la théorie statique a peu de chances de subsister.

Si les lombriciens agissaient bel et bien de manière dynamique face aux micropolluants organiques présent dans les sols, avons-nous des preuves expérimentales qui tendraient à soutenir cette théorie ?

## 5. TRANSFERT DES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES DES SOLS DANS LES TISSUS DES LOMBRICIENS.

Nous avons effectué deux recherches, l'une au moyen de la spectrométrie de masse et l'autre au moyen de champs de fluorescence totaux. Les résultats vont nous aider à voir de quelle manière les lombriciens absorbent les hydrocarbures polycycliques aromatiques présents dans le sol dans lequel ils vivent.

### 5.1. Carence de la littérature.

Il n'existe à notre connaissance en tout et pour tout que 3 recherches ayant étudié l'accumulation de PAH dans les tissus des lombriciens: Edwards et al. (1985), Marquenie et al. (1984) et Rhett et al. (1984).

Marquenie et al. (1984) met en évidence une teneur en Anthracène et en Benzo(a)Anthracène égale à 0,1 fois celle détectée dans les sols (sol = 0,1 à 4,0 mg/Kg P.S., *Eisenia foetida* = 0,01 à 0,5 mg/Kg P.S.). Les teneurs en Pyrène et en Benzo(a)Pyrène sont équivalentes à celles des sols (0,1 à 8,0 mg/Kg P.S.). Comme ces chercheurs n'ont pas vidé le contenu du tube digestif des lombriciens, leur recherche ne peut être comparée à celle effectuée par Edwards et al. (1985) dans notre laboratoire.

Cette dernière recherche a mis en évidence une accumulation sélective des PAH de faible poids moléculaire (Phe et Ft) dans les tissus de 3 classes de lombriciens : les vers *Nicodrilus* sp. adulte, les vers *Nicodrilus* sp. juvénile et les vers endogés. Les PAH de poids moléculaire élevés (B(k)F, B(a)P, BP) ne sont par contre pas du tout accumulés dans les tissus de ces trois catégories de lombriciens. Cette observation importante milite en faveur d'une tendance dynamique de gestion des polluants organiques de la part des lombriciens. Ces résultats sont malheureusement à considérer avec prudence car tous les échantillons de sol et de lombriciens de cette recherche ont été séchés à 105°C avant leur analyse. L'annexe No 1 de ce travail, axé sur le problème de la conservation des échantillons montre que cette méthode de séchage faisait perdre de l'ordre de 70% du phénanthrène présent dans un échantillon de boue d'épuration. Or il n'est absolument pas prouvé que ces pertes se font avec la même importance pour un échantillon de sol et un échantillon de lombriciens.

## 5.2. Les analyses des champs expérimentaux de la station de Liebefeld.

Les champs expérimentaux de la Station Fédérale en chimie agricole et sur l'hygiène de l'environnement de Liebefeld ont été abondamment utilisés dans l'étude des sources de micropolluants organiques dans les agroécosystèmes (chapitre 3, §7) et dans celle sur l'application des tests respirométriques destinés à étudier le comportement de la microflore terrestre (chapitre 4, §2). La description de ces champs se trouve au chapitre 3, §7. Nous avons souhaité connaître les taux de PAH dans les sols de référence et les sols amendés en boue d'épuration afin de pouvoir les comparer à ceux que l'on trouve dans les tissus des lombriciens vivant respectivement dans ces deux sols. Cette comparaison a été faite sur le site de Liebefeld uniquement (Tableau 23).

Tableau 23: Concentration en PAH des sols et des tissus de vers ( $\mu\text{g/Kg P.S.}$ ) du champ expérimental de Liebefeld.

PAH	SOL DE REFERENCE DU SITE DE LIEBEFELD			SOL AMENDE EN BOUES DU SITE DE LIEBEFELD			PLUIES EPENDES
	SOL	VERS	*FC	SOL	VERS	*FC	(ng/Kg)
Nph	14,59	54,16	3,71	13,79	47,55	3,45	**N.D.
Ace	4,46	3,41	0,76	9,72	5,99	0,62	N.D.
F	2,83	18,60	6,57	12,62	21,77	1,72	N.D.
Phe	39,65	23,69	0,60	120,53	41,56	0,34	283
An	3,08	1,95	0,63	23,91	7,16	0,30	3
Ft	64,74	35,30	0,54	341,43	127,82	0,37	297
Pyr	47,14	58,03	1,23	315,11	135,85	0,43	236
B(a)A	19,69	28,60	1,45	165,87	127,57	0,77	20
B(b)F	43,56	27,06	0,62	321,60	186,20	0,58	96
B(k)F	15,43	6,96	0,45	109,90	28,02	0,25	33
B(a)P	25,59	10,50	0,41	193,43	93,08	0,48	39
DBA	4,77	1,36	0,28	27,41	13,02	0,47	5
BP	28,38	11,41	0,40	229,16	101,32	0,44	31

\* FC = Facteur de Concentration.

\*\* N.D. = Non détecté.

Si nous essayons de replacer ces facteurs de concentration obtenus dans notre courbe de bioaccumulation dynamique (Figure 58), nous observons qu'ils ne s'adaptent pas du tout à la courbe proposée. Il est vrai que dans l'ensemble le comportement physico-chimique des PAH s'éloigne sensiblement de celui du groupe PCB-Dioxine sur lequel est basée cette courbe. Nous supposons que l'accumulation de micropolluants organiques dans les tissus des lombriciens dépend aussi fortement de la nature du micropolluant.

Cette constatation nous oblige à nous garder de trop vouloir généraliser le concept d'accumulation des micropolluants par les lombriciens.



### 5.3. Comparaison des proportions de différentes classes de PAH dans les tissus des lombriciens par rapport à celles du sol dans lequel ils vivent.

L'accumulation des micropolluants organiques par les lombriciens reste très délicate à prouver. Cependant l'action dynamique des lombriciens face aux micropolluants organiques du sol peut se placer sur un tout autre plan, celui de la modification des proportions de différentes classes de micropolluants dans les tissus des lombriciens par rapport à celles du sol.

Au paragraphe 5.2.4 du chapitre 4 consacré aux résultats du second test respirométrique, nous avons expliqué qu'il était possible au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur de masse de faire ressortir de manière comparative les abondances absolues et relatives des divers groupes méthylés et non méthylés appartenant à la même structure PAH de base. Le cas du groupe phénanthrène y est présenté. Nous allons utiliser cette technique pour étudier les abondances relatives de ces divers groupes dans un échantillon d'eau de pluie prélevé à 10 km de Liebefeld, sur un site agricole près d'Ependes (Canton de Fribourg). Ces abondances seront comparées à celles du sol amendé en boue d'épuration de Liebefeld et à celles des tissus de lombriciens vivant dans ce sol. L'eau de pluie, le sol et les lombriciens ont été prélevés le même jour, le 15 mai 1986. Les PAH ont été détectés dans l'eau de pluie d'une part et dans les sols et les tissus des lombriciens d'autre part au moyen des techniques analytiques indiquées respectivement aux fiches 2, 5 et 1, 5.

Trois groupes de PAH seront étudiés, ils se trouvent rassemblés dans le tableau 24.


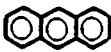
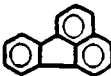

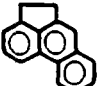
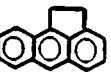
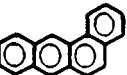
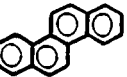
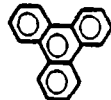
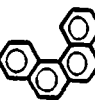

Il est à noter qu'aussi bien les PAH alkylés que non alkylés peuvent être d'origine anthropogénique [Wakeham et al. 1980a].

Dans l'interprétation des résultats il ne faut pas perdre de vue qu'un groupe de PAH diméthylé peut aussi contenir des isomères "éthyl". De la même manière un groupe de PAH triméthylé peut non seulement contenir des isomères "propyl" mais aussi des isomères "méthyl-éthyl".

Dans le groupe 1 l'anthracène n'est présent dans les échantillons de l'environnement qu'à l'état de traces. Il est fort probable dans ce cas que les trois groupes méthylés de valeur m/e = 192, 206 et 220 sont presque exclusivement des dérivés méthylés du phénanthrène. Cette observation est confirmée par Wakeham et al. (1980a) qui remarquent que la concentration de l'anthracène non substitué est environ 10% de celle du phénanthrène non substitué dans la couche superficielle de sédiments lacustres.

Dans le groupe 2 les dérivés méthylés seront principalement un mélange ( $\pm$  50/50) de composés du fluoranthène et du pyrène. Nous ne savons pas grand chose à propos du benzo(e)acénaphthylène et de l'aceanthrylène. Ils ne semblent pas être des contaminants persistants de l'environnement.

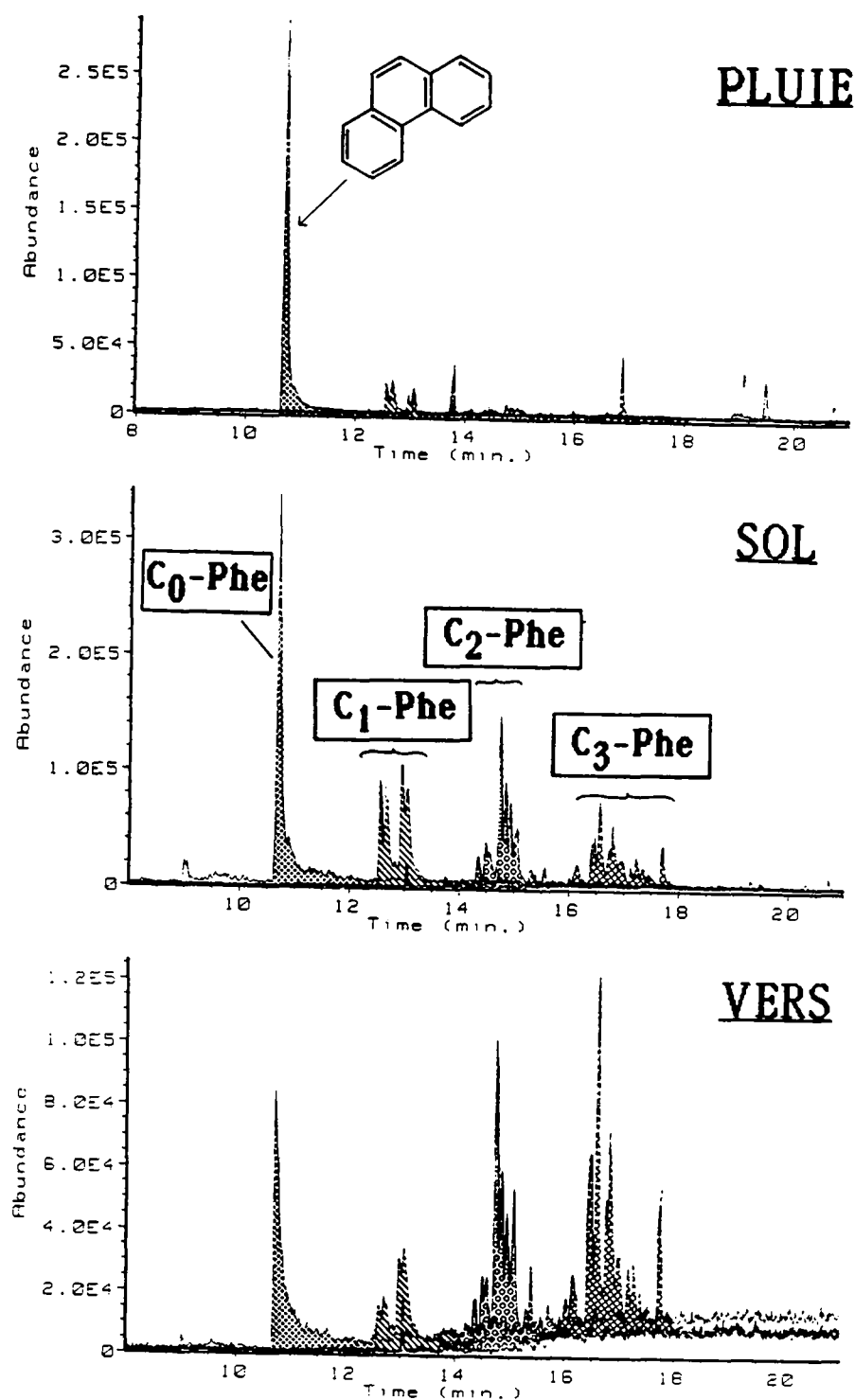
Tableau 24: Les 3 groupes de PAH étudiés d'après les proportions méthylés et non-méthylés.

GROUPES EXAMINES	PAH POSSIBLES	FORMULE PLANE	VALEUR m/e MONOMETHYLE DIMETHYLE ET TRIMETHYLE		
GROUPE 1 m/e = 178	PHENANTHRENE		192	206	220
	ANTHRACENE				
GROUPE 2 m/e = 202	FLUORANTHENE		216	230	244
	PYRENE				
	BENZO(e)ACE-NAPHTHYLENE				
	ACEANTHRYLENE				
GROUPE 3 m/e = 228	BENZO(a) ANTHRACENE		242	256	270
	CHRYSENE				
	TRIPHENYLENE				
	BENZO(c) PHENANTHRENE				
	NAPHTHACENE				

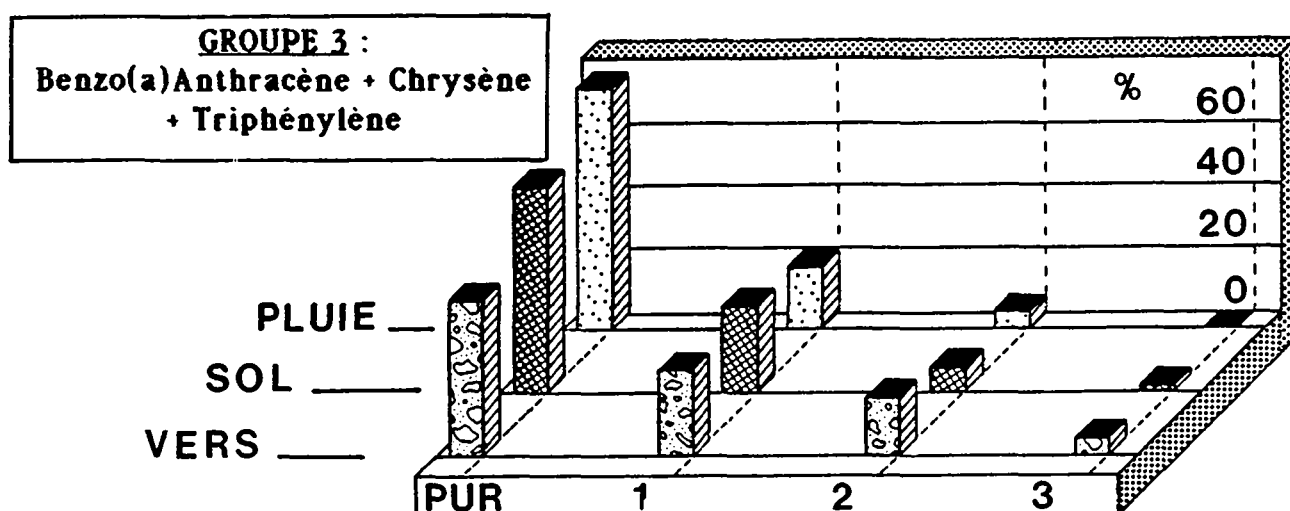
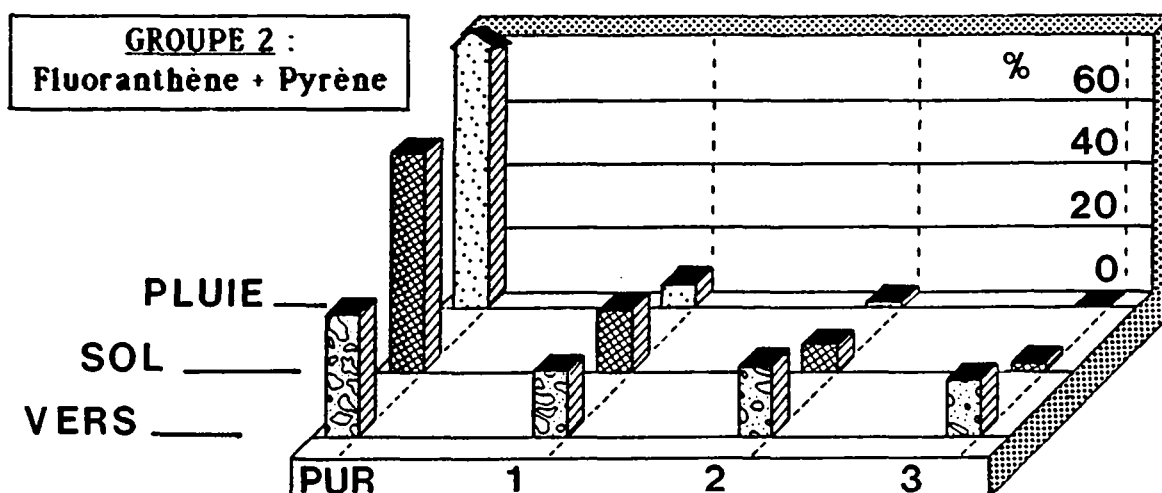
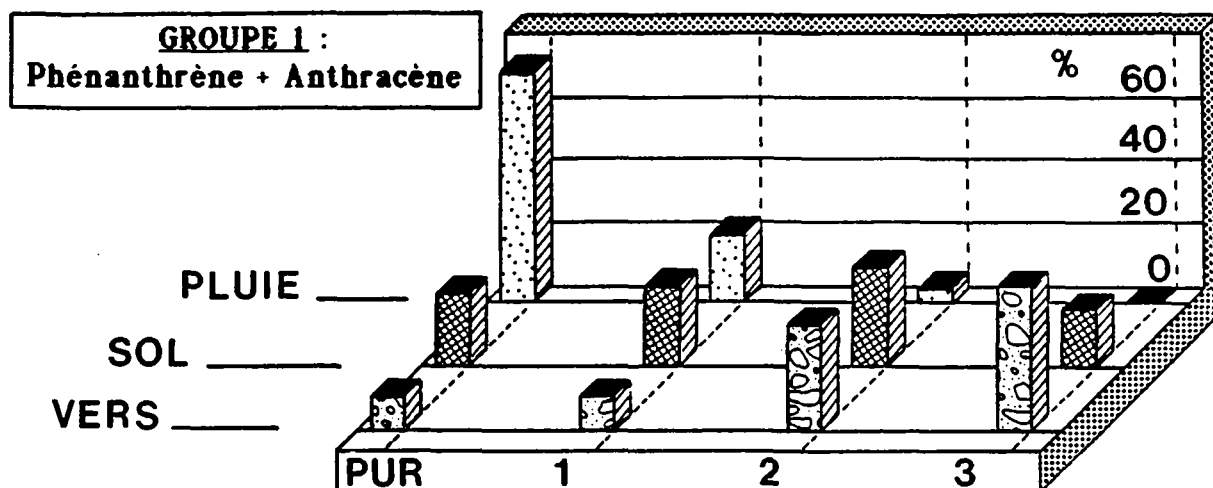
Dans le groupe 3, les dérivés méthylés peuvent aussi bien provenir du benzo(a)anthracène que du chrysène ou du triphénylène. Le naphthacène est très peu stable en général.

La figure 59 montre une superposition des chromatogrammes du "groupe phénanthrène" dans les 3 trois types d'échantillons étudiés. La figure 60 montre les abondances relatives, exprimées en %, des trois groupes de PAH étudiés dans les trois échantillons de l'environnement. Ces deux figures nous amènent à faire deux constatations :

# LE GROUPE PHENANTHRENE



**Figure 59** : Superposition de trois chromatogrammes illustrant les différents groupes de phénanthrènes alkylés et non alkylés dans un échantillon d'eau de pluie et deux échantillons corrélés de l'environnement. (C<sub>0</sub>-Phe - phénanthrène non alkylé, C<sub>1</sub>-Phe - monométhyl-phénanthrènes, C<sub>2</sub>-Phe - diméthyl-phénanthrènes + éthyl-phénanthrènes, C<sub>3</sub>-Phe - triméthyl-phénanthrènes + méthyl-éthyl-phénanthrènes + propyl-phénanthrènes)



**Figure 60 :** Abondance relative (%) des PAH non substitués (PUR) et des PAH ayant 1 substituant méthyl (1), 2 substituants méthyl ou 1 éthyl (2) et 3 substituants méthyl, 1 éthyl et 1 méthyl ou 1 propyl (3) dans un échantillon d'eau de pluie et deux échantillons corrélés du milieu terrestre.

Premièrement on assiste pour les trois groupes de PAH à une croissance de l'importance relative des groupes méthylés au fur et à mesure du passage pluie-sol-vers des échantillons. La croissance de la méthylation entre les échantillons "pluie" et "sol" doit être considérée avec prudence car ces 2 échantillons n'ont pas été prélevés aux mêmes endroits. La croissance entre les échantillons "sol" et "vers" est par contre tout à fait intéressante et milite en faveur d'une gestion dynamique des polluants par les lombriciens. La même observation est faite par Farrington (1983 et 1986b) ainsi que par Farrington et al. (1982, 1983 et 1986) en ce qui concerne la teneur en PAH de moules et de vers polychètes (annélides marins) par rapport à celle des sédiments marins.

Deuxièmement, la croissance de l'importance relative des groupes méthylés au fur et à mesure du passage pluie-sol-vers des échantillons s'estompe avec l'augmentation du poids moléculaire (178-202-228) des PAH non méthylés formant la base des trois groupes étudiés.

Essayons de rassembler les hypothèses qui donnent une base d'explication aux deux points précédents. On peut invoquer 4 raisons qui favorisent la part proportionnellement plus grande de PAH méthylés dans les tissus des lombriciens par rapport à celle que l'on trouve dans les sols dans lequel vivent ces lombriciens.

- Le lombricien peut absorber dans ses tissus une part plus importante de PAH méthylés que de non méthylés.

- Parmi tous les PAH qui entrent dans ses tissus, le lombricien peut excréter préférentiellement les PAH non méthylés.

- Le lombricien peut, grâce à la microflore de son tube digestif dégrader sélectivement les PAH non méthylés. Comme cette microflore est qualitativement différente de celle du sol dans lequel il vit [Rouelle 1982], des modifications dans les proportions PAH méthylés - PAH non méthylés peuvent survenir. Le lombricien n'agirait plus dans ce cas là sur les PAH que par l'intermédiaire des microorganismes.

- La quatrième raison est celle avancée par Farrington (1986). Des PAH d'origine pyrogénique et d'origine pétrolière peuvent entrer dans les écosystèmes. Les PAH d'origine pétrolière sont principalement des PAH méthylés [Wakeham et al. 1980a] contrairement aux PAH d'origine pyrogénique. Ces derniers sont plus fortement liés ou incorporés à des particules solides de l'atmosphère. Les PAH méthylés, d'origine pétrolière, pénètrent les écosystèmes sous une forme soluble, colloïdale ou faiblement adsorbés sur des particules solides. L'hypothèse est que ces PAH d'origine pétrolière sont relativement plus disponibles biologiquement que les PAH d'origine pyrogéniques. Les lombriciens peuvent entrer en contact avec ces deux types de PAH. Les précipitations

atmosphériques apportent principalement des PAH d'origine pyrolytique; les boues d'épuration et les lisiers animaux peuvent aussi apporter au sol des PAH d'origine pétrolière.

Les deux premières hypothèses font appel à des mécanismes physico-chimiques, propres aux molécules de PAH, et physiologiques. La troisième et la quatrième sont bien plus d'ordre biologique. Les quatre hypothèses sont plausibles, il s'agit peut-être même d'une combinaison de ces quatre hypothèses au regard des multiples voies d'entrée de substances organiques toxiques existant chez le lombricien. Le présent travail n'apportera pas de réponse précise aux différentes hypothèses. Relevons simplement qu'au moins une combinaison des deux premières hypothèses peut avoir lieu par le fait qu'en général les PAH méthylés sont moins solubles dans l'eau que leurs homologues non-méthylés. Le tableau 25 montre quelques chiffres illustrant ce fait.

Tableau 25: Solubilité dans l'eau de quelques PAH méthylés et non-méthylés en µg/litre à 25° C [Mackay 1977].

Naphthalène	31700	Anthracène	73
2-méthyl-naphthalène	25400	2-méthyl-anthracène	39
2,3-diméthyl-naphthalène	3000	9-méthyl-anthracène	261
2,6-diméthyl-naphthalène	2000	9,10-diméthyl-anthracène	56

Les PAH méthylés auraient sans doute une plus forte tendance à s'accumuler dans les tissus graisseux des lombriciens. Cette hypothèse est cependant fragile car on sait que le taux de matières extractibles à l'hexane (contenant donc principalement des graisses) est très faible chez le ver de terre en comparaison par exemple de celui des truites du lac Léman (Tableau 26).

Tableau 26 : Quelques taux de matières extractibles à l'hexane. (% du poids frais de l'échantillon)

SOL AMENDE EN BOUE DU SITE DE LIEBEFELD	TISSUS DES VERS DU SITE DE LIEBEFELD	TRUITES DU LAC LEMAN (*)
0,08 à 0,20	0,90 à 1,40	4,00 à 18,00

(\*) : Honsberger P. & Rossel D., 1985

Une dernière observation, bien fragile elle aussi, concerne les 4 pics qui traditionnellement forment l'ensemble des monométhyl-phénanthrènes (1-Me-Phe sur la figure 59). Ewald et al. (1981) ont étudié ce groupe de PAH dans des pétroles. Ils ont établi que les 2 premiers pics correspondaient respectivement au 3- et au 2-méthyl-phénanthrène. Le troisième pic est souvent le mélange non résolu du 4- et du 9-méthyl-phénanthrène. Le dernier pic correspond au 1-méthyl-phénanthrène (Figure 61).

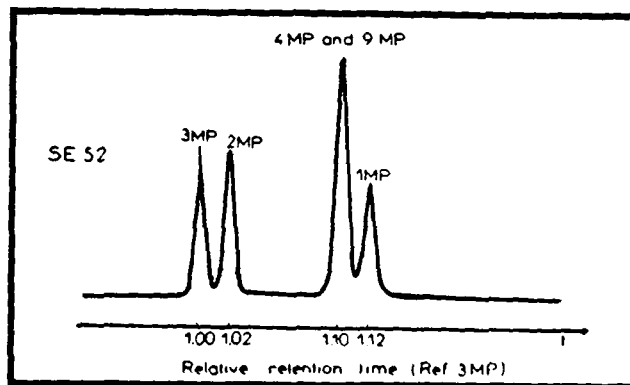


Figure 61: Chromatogramme GC/MS représentant les monométhyl-phénanthrènes d'une fraction de pétrole brut [Ewald et al. 1981].

On se contentera simplement d'observer sur la figure 59 que les proportions de 3- et 2-méthyl-phénanthrène par rapport au 4-, 9- et 1-méthyl-phénanthrène s'inversent dans le passage pluie-sol-vers des échantillons étudiés. Nous n'osons tirer quelque conclusion que ce soit de cette observation. Nous rendons simplement attentif au fait que les différents isomères du groupe monométhyl-phénanthrène sont assez facilement identifiables par GC-MS et peuvent de ce fait livrer des observations intéressantes dans des recherches "structure-comportement dans l'environnement".

#### 5.4. L'augmentation des proportions d'homologues alkylés du phénanthrène est elle générale dans tous les tissus des lombriciens par rapport à celles du sol ?

La comparaison des figures 62a et 63a, 62b et 63b montre immédiatement que cette augmentation n'est pas systématique. Dans notre cas il est probable que la boue d'épuration ait apporté au sol des PAH alkylés plus biodisponibles que ceux présents dans le sol non amendé en boue. Les lombriciens vivant dans le sol amendé en boue on donc pu absorber sélectivement davantage de phénanthrènes alkylés que ceux vivant dans le sol non amendé en boue d'épuration. Mais ceci reste une hypothèse.

#### 5.5. Les diagrammes de fluorescence totale.

Le chapitre 2 a décrit la technique utilisée pour obtenir les diagrammes de fluorescence totale. Les figures 64a, 65a et 64b, 65b montrent respectivement les diagrammes de luminescence (N.B. : luminescence est un synonyme de fluorescence) totale du sol et des tissus de lombriciens du site de référence et du sol et des tissus de lombriciens du site amendé en boue d'épuration. Après examen attentif de ces figures il apparaît qu'une différence importante existe entre les figures de luminescence totale des sols et des tissus de lombriciens des deux sites (comparaison horizontale 3 et 4 sur les diagrammes de luminescence). A chaque fois le massif ayant un maximum d'intensité de fluorescence situé à 295 nm d'excitation et 406 nm d'émission, présent dans les échantillons de sol, disparaît dans les échantillons de tissus des lombriciens.

Figure 62a  
SOL DE REFERENCE

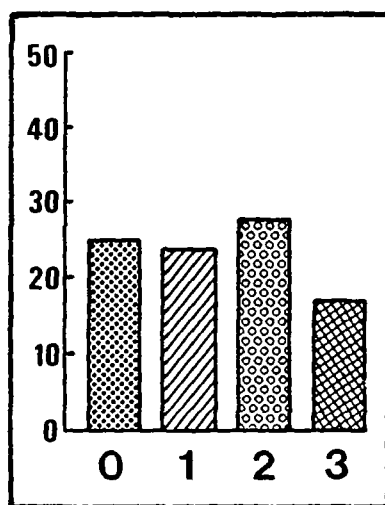


Figure 63a  
TISSUS DE LOMBRICIENS  
DU SOL DE REFERENCE

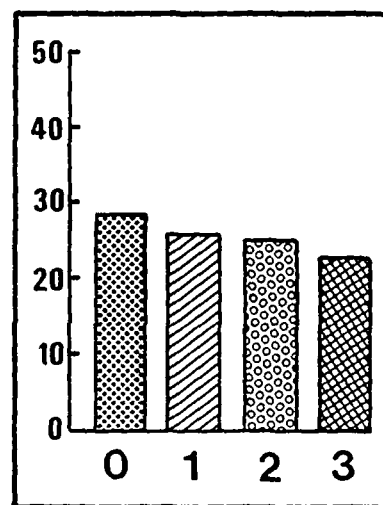


Figure 62b  
SOL AMENDE EN BOUE

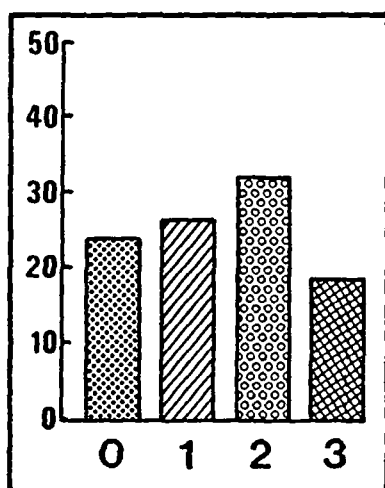
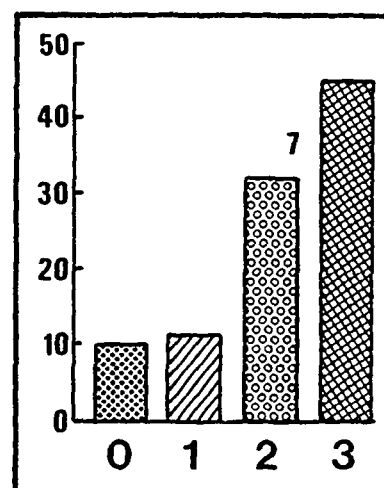


Figure 63b  
TISSUS DE LOMBRICIENS  
DU SOL AMENDE EN BOUES



Abondance relative (%) du phénanthrène pur (0) et des monométhyl-phénanthrènes (1), des diméthyl-phénanthrènes- ou des éthyl-phénanthrènes (2) et des triméthyl-, méthyl-éthyl- et propyl-phénanthrènes (3) dans les échantillons de sol et de tissus de lombriciens du site de Liebefeld ( $100\% = 0+1+2+3$ ).



# DIAGRAMMES DE LUMINESCENCE TOTALE

Figure 64 a  
SOL DE REFERENCE

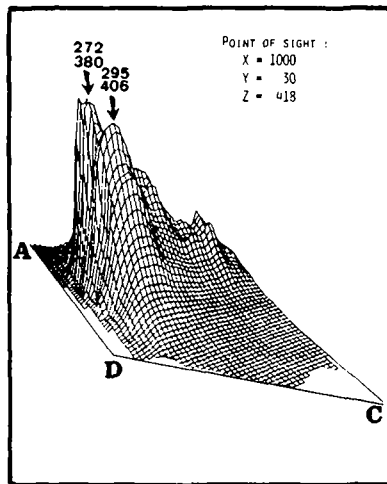


Figure 65 a  
TISSUS DE LOMBRICIENS  
DU SOL DE REFERENCE

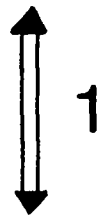
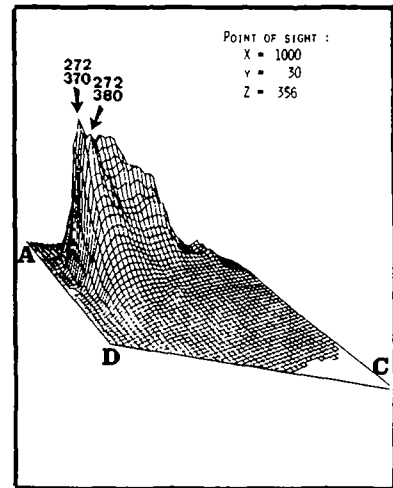


Figure 64 b  
SOL AMENDE EN BOUE

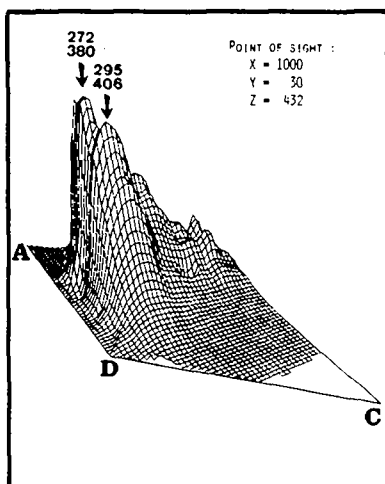
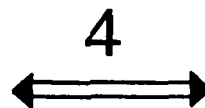
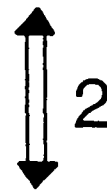
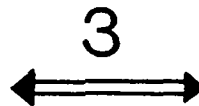
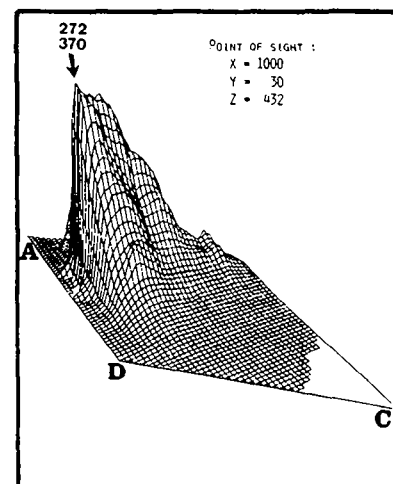


Figure 65 b  
TISSUS DE LOMBRICIENS  
DU SOL AMENDE EN BOUES



Conformément à l'hypothèse de Farrington (1986), mentionnée au paragraphe 5.3., le maximum de fluorescence à 295-406 nm pourrait être caractéristique des PAH d'origine pyrogénique, moins biodisponibles vis à vis des lombriciens.

La comparaison verticale sol-sol (1) et vers-vers (2) des diagrammes de luminescence totale (Figures 64 et 65) ne présente aucune différence notable du point de vue de l'allure générale du champ de fluorescence. Ceci voudrait dire que les proportions des différents groupes de substances fluorescentes sont semblables entre les deux échantillons de sol.

Cette observation milite elle aussi en faveur d'une gestion dynamique des PAH par les lombriciens. Ce maximum de fluorescence qui disparaît est caractéristique des PAH à 5 cycles. Or la figure 66 montre qu'il y a proportionnellement moins de PAH à 5 cycles, que dans le cas du site de référence. La disparition du maximum de fluorescence a cependant lieu dans les 2 sites. Nous supposons donc qu'une série de PAH supplémentaires, que nous ne pouvons pas analyser faute de standards, participent à cet effet de disparition.

#### 5.6 Diagrammes de contours et temps de rétention.

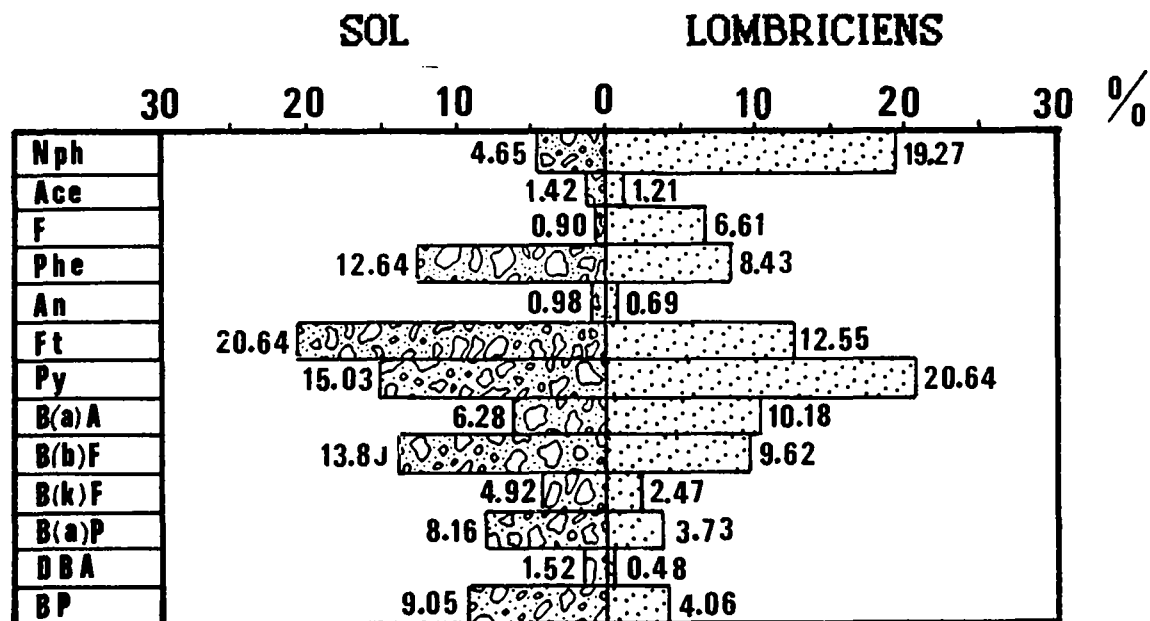
Afin de vérifier cette hypothèse nous avons créé au moyen du programme "CIP" (exposé dans le chapitre 2, §3.2) des diagrammes de contours qui tiennent compte des temps de rétention des différents PAH lors d'une analyse classique par chromatographie liquide. Le but de cette opération est d'observer si un échantillon de l'environnement contient des substances fluorescentes supplémentaires des 15 PAH sélectionnés dans notre standard.

Pour les réaliser nous avons couplé la pompe de l'HPLC au détecteur de fluorescence. Ensuite nous avons enregistré 40 chromatogrammes d'un mélange de 15 standards de PAH et d'un extrait purifié de boue d'épuration digérée anaérobie de la station d'épuration de Morges (canton de vaud). La procédure de chromatographie liquide utilisée est explicitée en annexe No 2 de ce travail, à la fiche analytique No 10. Pour ces 40 chromatogrammes la longueur d'onde d'excitation a été maintenue constante à 295 nm. La longueur d'onde d'émission par contre a été augmentée de 315 à 510 nm avec entre chaque chromatogramme un intervalle de 5 nm. Les maxima de fluorescence les plus importants ont été enregistrés dans la mémoire de l'ordinateur et le programme "CIP" a été appliqué pour obtenir les diagrammes de contours.

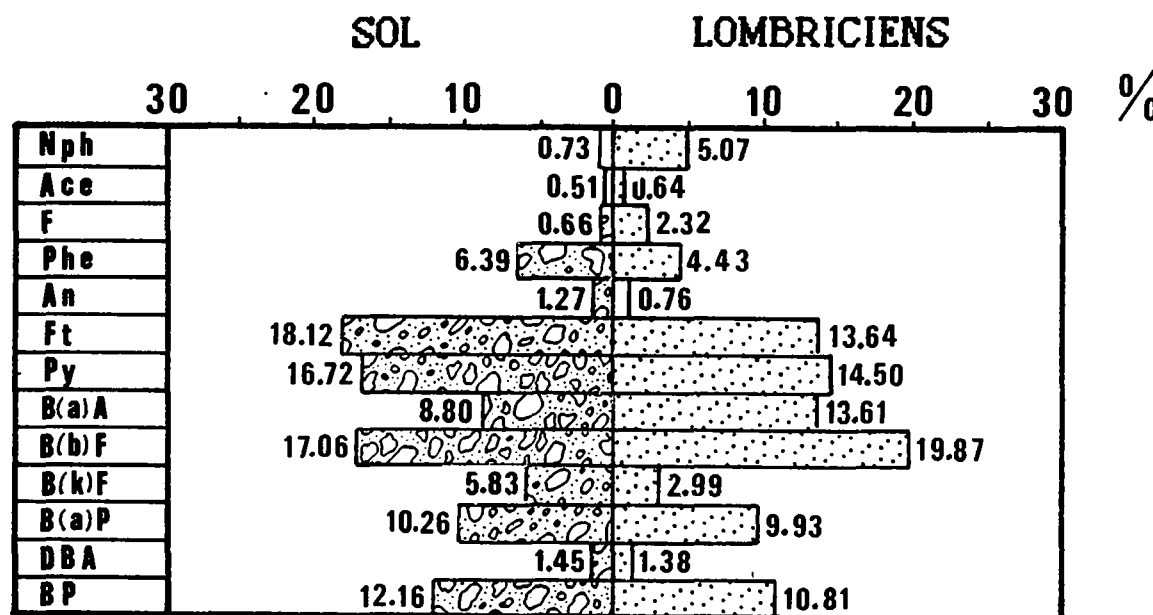
Le diagramme de contour du mélange de standards (Figure 67a):  
Parmis les 15 PAH de ce mélange, seul l'anthracène n'est jamais détecté. En effet, ce produit n'est absolument pas sensible à la longueur d'onde d'excitation sélectionnée. On observera qu'à son temps de rétention habituel de 22 minutes aucune substance n'est détectée. On constate que la zone de détection des PAH se déplace progressivement vers les grandes longueurs d'ondes d'émission au

**Figure 66 : Distribution des PAH détectés dans les tissus des lombriciens et dans le sol dans lequel ils vivent (Liebefeld -CH)**

**A) Le site de référence**



**B) Le site amendé en boue d'épuration**



fur et à mesure de l'augmentation du nombre de cycles de ces PAH. C'est un phénomène connu dans les systèmes aromatiques conjugués, tel que les PAH : l'énergie restituée par les molécules de PAH excitées diminue en fonction de l'augmentation de la délocalisation des électrons de ces systèmes, donc en fonction de l'augmentation du nombre de cycles.

Le diagramme de contour de l'extrait de boue d'épuration (Figure 67b): En plus des 14 PAH détectés dans le mélange standard, on détecte 14 autres substances fluorescentes non identifiées. Le couple de longueurs d'ondes qui nous intéresse (295-406 nm) est celui dont la fluorescence disparaît dans les tissus des lombriciens (Fig. 65 a et b), alors qu'elle présentait un maximum dans les échantillons de sol (Fig. 64 a et b). A ces longueurs d'ondes là (indiquées par une ligne en traits sur la figure 67b) on remarque que 6 substances fluorescentes inconnues apparaissent dans cet échantillon de boue d'épuration. Il se peut donc très bien que les différences de fluorescence entre les échantillons de sol et de tissus de lombriciens soient le fait de substances fluorescentes que nous ne pouvons identifier faute de standards.

Dans tous ces types de transfert de polluants organiques d'un biotope vers une biocénose il ne faut jamais perdre de vue que les polluants sont extraits des échantillons au moyen de procédures chimiques qui ne reflètent pas nécessairement la réalité de l'environnement. Ainsi une extraction chimique mise au point en laboratoire peut ne pas extraire tous les polluants présents dans les tissus des lombriciens, mais bien ceux présents dans le sol. Rien ne nous prouve que les extractions de polluants organiques se font de la même façon dans le biotope et dans la biocénose, bien que des techniques d'extraction identiques soient appliquées dans les deux cas. Aussi doit on signaler que les différences de fluorescence observées entre les échantillons de sol (Fig. 64 a et b) et les échantillons de lombriciens (Fig. 65 a et b) peuvent être attribuées à une sélectivité dans l'extraction chimique des polluants organiques plutôt qu'à une sélectivité biologique.

Une autre observation intéressante de cette figure est que les domaines de détection des substances correspondant au 14 PAH du standard (en noir sur les deux figures) ont toujours des zones de détection un peu différentes de celles enregistrées pour l'échantillon de boue d'épuration. Exemple, la zone de détection du phénanthrène s'étale pour le standard entre 330 et 435 nm, alors que pour l'extrait de boue d'épuration elle s'étale entre moins de 315 et 405 nm. Les zones de détection peuvent même varier très fortement entre le standard et l'extrait de boue, tel est le cas pour le fluoranthène et le pyrène. Deux raisons peuvent être invoquées :

La première est que dans l'extrait de boue d'épuration un bon nombre d'impuretés peuvent encore être présentes. Elles peuvent éventuellement interférer avec la substance à analyser en augmentant sa fluorescence totale.

figure 67a

Diagramme de contours représentant 14 standards de PAH sur 40 chromatogrammes en phase liquide enregistrés au moyen d'un détecteur de fluorescence entre 315 et 510 nm de longueur d'onde d'émission.

Longueur d'onde d'excitation fixe : 295 nm.

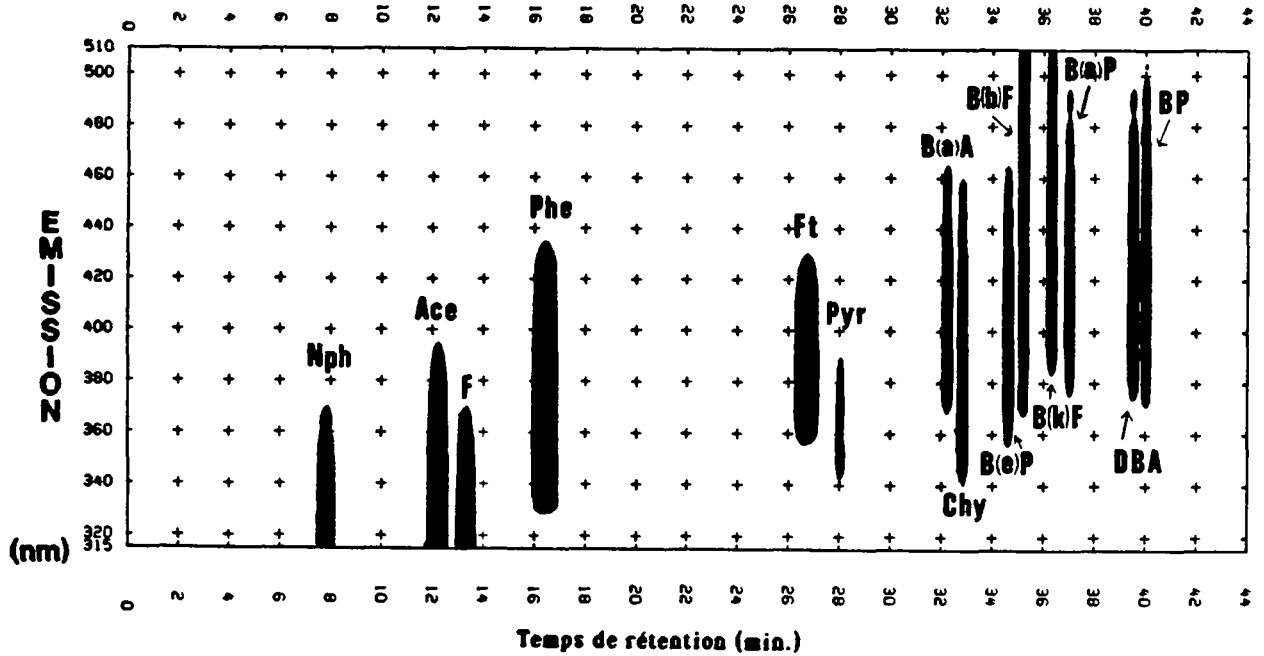
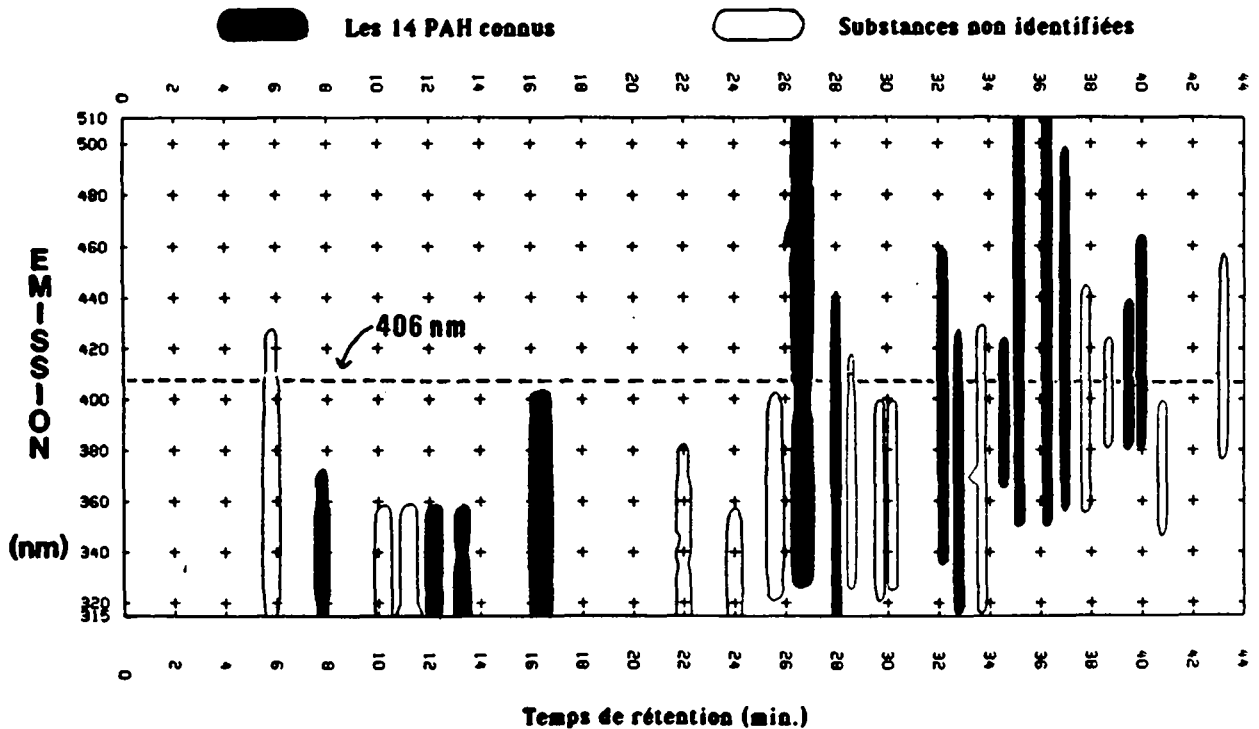


figure 67b

Diagramme de contours représentant toutes les substances fluorescentes présentes dans la fraction aromatique d'un échantillon de boue d'épuration. Enregistrement de 40 chromatogrammes en phase liquide entre 315 et 510 nm de longueur d'onde d'émission.

Longueur d'onde d'excitation fixe : 295 nm.



La seconde est que la technique chromatographique utilisée sépare les PAH en fonction du nombre de cycles et de leur positions respectives, mais pas en fonction des substituants qui peuvent éventuellement être greffés sur ces cycles. Le tableau 27, tiré de Rhys Williams (1980), fait une synthèse des effets que peuvent avoir les groupements fonctionnels les plus connus sur les maxima de fluorescence des PAH.

Tableau 27: Effets de quelques groupements fonctionnels sur l'intensité et les longueurs d'ondes de fluorescence des PAH.

Groupements fonctionnels	Effet sur $\lambda$	Effet sur intensité
-OH, -OCH <sub>3</sub> , -NH <sub>2</sub> , -NHR, -NR <sub>2</sub>	Augmente	Augmente
-COOH, -NO <sub>2</sub> , -NO	Diminue	Diminue
-F, -Cl, -Br, -I	Diminue	Diminue
Alkyl	Aucun	Faible
Aromatique	Augmente	Augmente

Le tableau 27 nous montre aussi que l'alkylation de substances fluorescentes n'a pratiquement aucune influence sur la position et sur l'intensité de leurs bandes de fluorescence. Il est donc vraisemblable que les différences dans les fluorescences totales des sols (Fig 64 a et b) et des lombriciens (Fig. 65 a et b) ne sont pas attribuables à des modifications de proportions d'homologues alkylés, tels que présentées sur les figures 62 et 63. Ces différences peuvent être la conséquence de la présence dans le sol d'autres PAH (non identifiables faute de standards) qui sont par contre absents dans les tissus des lombriciens.

## 6. CONCLUSIONS DE CETTE PARTIE DE LA RECHERCHE.

Toutes les données rassemblées dans ce chapitre convergent vers une idée maîtresse : les lombriciens agissent de façon dynamique à l'encontre d'une pression de micropolluants organiques. Ce chapitre a montré que cette action dynamique des lombriciens réside davantage dans des modifications de proportions de micropolluants organiques dans ses tissus, par rapport à celles du sol dans lequel il vit, que par un réel mécanisme d'accumulation qui est difficile à prouver et dont l'existence reste hypothétique. On ne fournira de preuves solides de la bioaccumulation de micropolluants par les lombriciens que lorsqu'on aura uniformisé certains paramètres : le sol et les techniques analytiques.

Finalement, il est assez surprenant de constater que la simple action biologique des lombriciens semblent avoir plus d'impact sur les proportions de micropolluants du sol que 10 années d'épandage intensif de boue d'épuration.

## **CHAPITRE 6**

### **CONCLUSIONS**

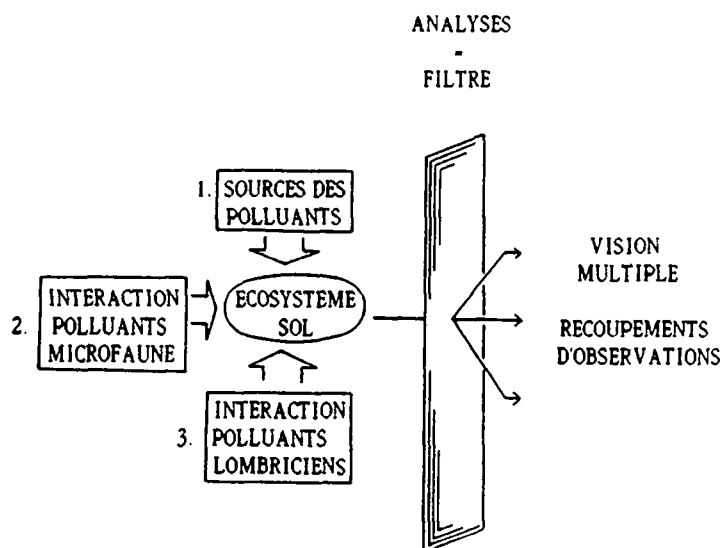
A la fin de cette étude sur la connaissance des sources et de la dynamique de quelques polluants prioritaires dans l'écosystème sol, nous mettrons l'accent sur la méthodologie d'approche d'un problème écotoxicologique lié à cet écosystème.

A l'opposé des l'écosystèmes aquatiques, l'écosystème sol ne peut presque pas être modélisé en laboratoire. Ceci implique que les études du comportement de polluants dans l'écosystème sol doivent la plupart du temps se faire "in situ" avec l'inconvénient de ne pas maîtriser l'ensemble des paramètres.

Pour remédier à ce problème nous proposons que la résolution d'un problème écotoxicologique lié à un écosystème aussi complexe que le sol passe par une approche systémique.

La démarche scientifique visant à approcher chaque élément du système consiste à procéder le plus possible par des recoupements d'observations.

Le système que nous avons élaboré dans ce travail est illustré sur le schéma suivant :



Ce schéma indique que l'étude des interactions des micropolluants organiques avec l'écosystème sol a été abordée par trois voies d'entrée :

- les sources des micropolluants dans l'écosystème sol,
- les interactions des micropolluants avec la microfaune du sol,
- les interactions des micropolluants avec les lombriciens.

D'autres entrées auraient tout aussi bien pu être sélectionnées tels que, par exemple, l'interaction des micropolluants avec les éléments constitutifs du sol.

L'image qui en fin de compte nous reste de ces interactions des micropolluants organiques avec l'écosystème sol dépend fortement des techniques analytiques sélectionnées. Ces techniques agissent comme autant de filtres qui à chaque fois nous donnent une certaine image du polluant.

Ce travail aura montré que l'outil analytique n'est pas seulement passif en écotoxicologie, mais qu'il se crée en fonction d'une démarche scientifique pour apporter des renseignements tant qualitatifs que quantitatifs.

Ce qui nous paraît important dans l'utilisation de l'analyse chimique en écotoxicologie c'est la complémentarité de différentes méthodes. Ainsi nous avons démontré au moyen de deux techniques analytiques totalement différentes que des modifications des proportions de micropolluants se manifestent entre celles des tissus des lombriciens et celles du sol dans lequel ils vivent. La première technique est la spectrométrie de masse couplée au chromatographe en phase gazeuse (GCMS), qui est une technique à haute résolution de séparation et d'identification de substances organiques. La seconde est la fluorescence qui, telle que nous l'avons utilisée, est une technique de visualisation globale de tous les PAH présents dans les échantillons. Nous croyons en une complémentarité de ces deux techniques. Nous pensons que l'utilisation de deux techniques analytiques très différentes pour résoudre un problème écotoxicologique peut fournir des recoupements de résultats intéressants.

En plus des techniques analytiques différentes, nous proposons d'aborder un problème écotoxicologique en intégrant l'étude simultanée de plusieurs polluants qui varient par leurs caractéristiques physico-chimiques, telles que la polarité, la configuration stérique, l'absence ou la présence de certains groupements fonctionnels. Dans ce cas aussi le recoupement d'observations permet d'en augmenter la crédibilité. Ainsi dans l'étude des sources de micropolluants organiques dans les sols agricoles, nous avons mis en évidence que l'apport de boue d'épuration augmente aussi bien la teneur en PAH que celle en PCB de faibles poids moléculaires.

Cette étude a montré qu'il ne faut pas raisonner en terme de "familles" de micropolluants, mais qu'il convient dans la mesure du possible d'étudier chaque composé séparément. Cette tendance va dans le sens de la législation actuelle en matière de substances dangereuses, qui tend à traiter spécifiquement certains isomères ou congénères.



Nous venons de voir que le rôle de l'outil analytique est déterminant dans la démarche écotoxicologique. En fonction des outils analytiques choisis ou créés dans chacune de nos trois entrées nous sommes amenés à formuler des conclusions spécifiques pour celles-ci :

#### 1) LES SOURCES DE MICROPOLLUANTS ORGANIQUES DANS LES SOLS.

Cette approche a montré l'importance des précipitations atmosphériques dans la contamination en PAH des sols situés à proximité d'une zone urbaine. Cette observation concerne probablement de très nombreux sols agricoles ayant cette situation.

Les boues d'épuration viennent en seconde position parmi les facteurs responsables de la contamination des sols agricoles, mais elles apportent des micropolluants organiques de poids moléculaires légers contrairement aux précipitations atmosphériques qui en apportent de poids moléculaires lourds.

Des comparaisons quantitatives entre les diverses sources de micropolluants organiques dans les sols sont faisables mais ont-elles une signification écotoxicologique ?

Hormis une structure chimique de base qui se ressemble, un trichlorobiphényle (apporté principalement par les boues) et un hexachlorobiphényle (apporté principalement par les précipitations) sont deux substances qui peuvent avoir des comportements différents dans les sols récepteurs et leurs biocénoses.

Est-il nécessaire de proposer des valeurs limites en ce qui concerne la concentration dans les boues d'épuration des deux familles de polluants organiques (PAH et PCB) étudiées dans ce travail ?

Nous venons de voir que les boues d'épuration n'étaient qu'une source parmi d'autres de la contamination des sols par ces produits et qu'en fait on se trouve face à une contamination globale. Plutôt que de proposer des valeurs limites de concentration en polluants organiques dans les boues destinées à l'agriculture, il faut développer les actions tendant à diminuer la contamination générale de l'environnement par les PCB et les PAH, et tout particulièrement la forte émission de ces derniers par les agglomérations urbaines.

En ce qui concerne l'épandage de boues d'épuration, nous avons vu que la persistance de micropolluants organiques dans les sols serait la conséquence d'épandages fréquents de boues modérément contaminées, plutôt que d'épandages isolés de boues fortement contaminées en PAH et en PCB. L'instauration de valeurs limites n'aurait probablement qu'un faible effet sur la diminution des teneurs en micropolluants organiques des sols. L'application des normes d'épandages existantes (7,5 T m.s. par hectare et sur trois années [D.F.I. 1984]) doit être plus scrupuleusement respectée. Les figures 27 et 28 montrent que souvent ce n'est pas le cas.

## 2) L'INTERACTION DES MICROPOLLUANTS AVEC LA MICROFAUNE DU SOL.

Le but de ce chapitre était de voir pourquoi dans certains sols, fortement amendés en boue d'épuration, les PAH s'étaient accumulés, contrairement aux observations faites pour la majorité des sols agricoles que nous avons étudié.

Les deux tests respirométriques n'ont pas pu mettre en évidence que de grandes quantités de boues d'épuration perturbent la microflore du sol dans un sens néfaste à la dégradation des PAH. En revanche, les tests ont montré que des apports de PAH purs aux sols se traduisent par des inhibitions de la respiration des micro-organismes dont l'importance varie en fonction de la nature du sol.

A notre avis l'Ordonnance Fédérale sur les boues d'épuration devrait prendre en compte les différents types de sols existants. Des études plus approfondies, réunissant des écotoxicologues et des pédologues, devraient dans les années à venir définir les types de sol les plus aptes à recevoir des boues d'épuration sans risquer de trop perturber leurs biocénoses. Elles devraient tenir compte de trois facteurs étroitement liés, à savoir : le taux de matières organiques du sol, le degré de persistance des micropolluants organiques et la fréquence des épandages de boues d'épuration. Ce dernier point influence sensiblement les deux premiers.

## 3) L'INTERACTION DES MICROPOLLUANTS AVEC LES LOMBRICIENS.

On n'insistera jamais assez sur le rôle fondamental qu'ont les lombriciens dans les sols. Ils ont une fonction essentielle d'aération et de structuration des sols et contribuent fortement à leur fertilité. D'éventuelles contaminations des sols par des polluants organiques et métalliques peuvent avoir des conséquences graves sur les lombriciens, telles que des mortalités ou des pénétrations de polluants dans leurs tissus. Ce dernier point est particulièrement important à étudier car on sait que les vers de terre constituent la base de l'alimentation de certains oiseaux et mammifères.

Dans ce chapitre nous avons montré que les lombriciens agissent de façon dynamique face aux micropolluants organiques présents dans le sol. Cette action réside davantage dans des modifications de proportions de micropolluants organiques dans leurs tissus par rapport à celles du sol dans lequel ils vivent, que dans un réel mécanisme d'accumulation qui est difficile à prouver et dont l'existence reste hypothétique : il est difficile de comparer des concentrations de polluants dans le sol, exprimées par rapport au poids sec de celui-ci, avec celles détectées dans les tissus des lombriciens et exprimées par rapport à leur poids frais (leur poids sec n'ayant que peu de signification biologique).

Dans notre publication sur les méthodes d'extraction et d'analyse des PCB des tissus des lombriciens (Annexe 4), nous avons émis l'hypothèse que les lombriciens puissent constituer un excellent indicateur de la pollution des sols par les micropolluants.

Actuellement nous devons nuancer cette supposition par le fait que les micropolluants organiques contenus dans les tissus des lombriciens varient souvent qualitativement et quantitativement de ceux contenus dans le sol.

Pour ce qui est de la contamination du sol proprement dit, ce travail n'a pas permis de montrer la valeur bioindicatrice des lombriciens. Par contre nous avons montré qu'en opérant une sélection parmi les polluants qu'ils accumulent, les lombriciens fournissent des renseignements intéressants sur les types de polluants que les animaux, faisant partie des échelons supérieurs du réseau trophique, risquent d'accumuler.

Duvigneaud (1974) indique dans son livre "la synthèse écologique" que l'écosystème sol est l'entité biologique illustrant le mieux la complexité d'un écosystème. Cette phrase devrait être inscrite à côté de chaque résultat obtenu dans ce travail afin de ne pas trop vouloir les généraliser.

A partir du moment où les micropolluants organiques sont mélangés et souvent étroitement liés aux constituants du sol, leur dégradation chimique, physique ou biologique ainsi que leur impact sur la biocénose dépendront fortement de ces liens.

Chaque sol étudié nous montrera sans doute un comportement particulier des micropolluants. Cependant certaines grandes tendances de comportement, probablement valables pour de nombreux types de sol, se dégagent. La plupart d'entre elles ont été discutées dans ce travail :

- Les micropolluants peu dégradables tels que les PCB et les PAH sont principalement apportés dans les sols agricoles par les précipitations atmosphériques.
  - Ils s'accumulent dans les premiers centimètres de la couche superficielle du sol.
  - Leur persistance est étroitement liée à la teneur en matière organique du sol.
  - Ils influencent l'activité des micro-organismes du sol à des degrés divers, dépendants principalement de la nature du sol.
  - Ils sont absorbés sélectivement dans les tissus des lombriciens sans y être systématiquement bio-accumulés.
-



## BIBLIOGRAPHIE

A
---

- ACHESON M.A., HARRISON R.M., PERRY R., WELLINGS R.M. (1976) :  
*Factors affecting the extraction and analysis of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in water*, Water Research, 10, 207.
- ADAMS J.D., LAVOIE E.J., HOFFMANN D. (1982) :  
*Analysis of methylated polynuclear aromatic hydrocarbons by capillary GC : influence of temperature on the pyrosynthesis of anthracene, phenanthrene and their methylated derivatives*, J. Chromatographic Sci., 20, 274.
- AGBIM N.N., SABEY B.R., MARKSTROM D.C. (1977) :  
*Land application of sewage sludge : V. Carbon dioxide production as influenced by sewage sludge and wood waste mixtures*, J. Environ. Qual., 6, 446.
- AHEL M., GIGER W. (1985a) :  
*Determination of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography*, Anal. Chem., 57, 1577.
- AHEL M., GIGER W. (1985b) :  
*Determination of nonionic surfactants of alkylphenol polyethoxylate type by high-performance liquid chromatography*, Anal. Chem., 57, 2584.
- AHMED M., FOCHT D.D. (1973) :  
*Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of Achromobacter*, Can. J. Microbiol., 19, 52.
- AICHBERGER K., REIFENAUER (1983) :  
*Determination of Polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge*, In : Processing and use of sewage sludge, Proc. third Int. Symp., Brighton, sept. 27-30, 161.
- ALBAIGES J., ALGABA J., BAYONA J.M., GRIMALT J. (1982) :  
*New perspectives in the evaluation of anthropogenic inputs of hydrocarbons in the Western Mediterranean coast*. With workshop on marine pollution of the mediterranean, Cannes, december 2-4 1982, 199.
- ALBAIGES J., GRIMALT J. (1982) :  
*Fingerprinting of environmental Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by high speed HPLC*. Chrom. Newsletter, 10, 1, 8

- ANDERSON J.R. (1978) :  
*Some methods for assessing pesticide effects on non-target soil micro-organisms and their activities.* In "Pesticide Microbiology". Eds.: HILL I.R., WRIGHT S.J.L., Academic Press, London, 247.
- ANNA J., PLOGER E., REUPERT R. (1984) :  
*Identifizierung und bestimmung von organischen schadstoffen in klärschlamm verschiedener herkunft,* Gewässerschutz, Wasser und Abwasser, 65, 315.
- ANTHONY R.M., BREIMHURST L.H. (1981) :  
*Determination maximum influent concentrations of priority pollutants for treatment plants.* J. Water Pollut. Control Fed., 53, 1457.
- ATWATER J.W. (1984) :  
*A case study of a chemical spill. Polychlorinated biphenyls (PCBs) revisited.* Water resources research, 18, 525.

B
---

- BACCI E., GAGGI C. (1985) :  
*Polychlorinated Biphenyls in plant foliage : translocation or volatilisation from contaminated soils ?* Bull. Environ. Contam. Toxicol., 35, 5, 673.
- BALLSCHMITER K., ZELL M. (1980) :  
*Analysis of PCB by glass capillary gas chromatography,* Fresenius Z. Anal. Chem., 302, 20.
- BARDIYA M.C., GAUR A.C. (1968) :  
*Influence of insecticides on carbon dioxide evolution from soil.* Indian J. Microbiol., 8, 233.
- BARTHA R., PRAMER D. (1965) :  
*Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticide in soil.* Soil Sci., 100, 68.
- BAYER H., MITTERER M., SCHINNER (1982) :  
*Der Einfluss von Insektiziden auf microbiogene Prozesse in A -Materialien eines landwirtschaftlich genutzen Bodens.* Pedobiologia, 23, 311.
- BAYONA J.M., ALBAIGES J., SOLANAS A.M., PARES R., GARRIGUES P., EWALD M. (1986) :  
*Selective aerobic degradation of methyl-substitued polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by pure microbial cultures,* Intern. J. Environ. Anal. Chem., 23, 289.

- BAXTER J.C., JOHNSON D.E., KIENHOLZ E.W. (1983) :  
*Heavy metals and persistent organics content in cattle exposed sewage sludge.* J. Env. Qual., 12, 3, 316.
- BAZELEY G.P., CHEUNG Y.K., IRONS Y.K., ZIENKIEWICZ (1965) :  
*Triangular elements in bending-conforming and nonconforming solutions,* Proc. 1st Conf. Matrix Methods on struct. mech., Air Force Inst. of Techn. Wright Patterson, A.T. Base Ohio, 547.
- BENTZ A.P. (1976) :  
*Oil spill identification,* Anal. Chem., 48, 454A.
- BERLMAN I.B. (1971) :  
*Handbook of fluorescence spectra of Aromatic molecules.* Academic Press, NY.
- BEST J.A., WEBER J.B. (1974)  
*Disappearance of S-triazines as affected by soil pH using a balance-sheet approach.* Weed Sci., 22, 364.
- BEYER N.W., GISH C.D. (1980)  
*Persistence in earthworms and potential hazards to birds of soil applied DDT, Dieldrin & Heptachlor.* J. applied ecology, 17, 295.
- BIDLEMAN T.F., CHRISTENSEN E.J., HARDER H.W. (1981) :  
*Aerial deposition of organochlorines in urban and coastal South Carolina,* In : Atmospheric pollution in natural waters, Ed.: EISENREICH S.J., Ann Arbor Sci. Publ., 481.
- BJORSETH A. (1983) :  
*Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, vol. 1 & 2,* Marcel Dekker.
- BLADES-FILLMORE L.A., CLEMENT W.H., FAUST S.D. (1982) :  
*The effect of sediment on the biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol in Delaware river water.* J. Environ. Sci. Health, Part A, Environ. Sci. Eng., 17, 797.
- BLUMER M. (1976) :  
*Polycyclic aromatic compounds in nature,* Sci. American, 35.
- BLUMER M., YOUNGBLOOD W.W. (1975) :  
*Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and recent sediments,* Science 188, 53.
- BOLLAG J.M. (1983) :  
*Cross-coupling of humus constituents and xenobiotic substances,* In : "Aquatic and terrestrial humic materials", CHRISTMAN R.F., GJESSING E.T. Eds., Ann Arbor sci. publ., Michigan, 127.

- BORNEFF J., FARKASDI G., GLATHE H., KUNTE H. (1973) :  
*The fate of polynuclear aromatic hydrocarbons in experiments using sewage sludge - garbage composts as fertilisers*, Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 157.
- BOUCHE M. (1984) :  
*Les vers de terre*, La Recherche, 156, 796.
- BOYKINS E. (1966):  
*DDT residues in the food chains of birds*. Atlantic Naturalist, 21, 18.
- BOYLE T.P., ROBINSON W., PATTY J.D. (1980) :  
*Degradation of pentachlorophenol in a simulated lentic environment*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 24, 177.
- BROOKSBANK P. (1983)  
*The canadian network for sampling organic compounds in precipitation*, Environment Canada, Technical Bulletin No 129.
- BRUNNER I., SCHINNER F. (1984):  
*Einfluss von Blei und Cadmium auf die mikrobielle Aktivität eines Bodens*. Die Bodenkultur, 35, 1.
- BRUSCHWEILER H., GAMPERLE H., SCHWAGER F. (1983) :  
*Primärabbau, vollständiger Abbau und Abbauprodukte von Alkylphenoylethoxylaten*. Tenside Detergents, 20, 6, 317.
- BULMAN T.L., LESAGE S., FOWLIE P.J.A., WEBER M.D. (1985) :  
*The persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil*. Environment Canada, PACE report No 85-2 prepared for the Petroleum Association for Conservation of the Canadian Environment, November 1985.

C
---

- CARAGAY A.B., LEVINS P.L. (1979) :  
*Evaluation of protocols for pesticides and PCB's in raw wastewater*, Technical Report Data EPA 600/2-79-166
- CHANG F.H., BROADBENT F.E. (1982) :  
*Influence of some metals on some soil nitrogen transformations*, J. Env. Qual., 11, 1.
- CHAUSSOD R., NICOLARDOT B., CATROUX G. (1986) :  
*Mesure en routine de la biomasse microbienne des sols par la méthode de fumigation au chloroforme*, Science du sol, 2, 201.



- CHIOU C.T., FREED V.H., SCHMEDDING D.W., KOHNERT R.L. (1977) :  
*Partition coefficient and bioaccumulation of selected organic chemicals*, Environ. Sci. Technol., 11, 475.
- CHRISTIAN G.D., CALLIS J.B., DAVIDSON E.R. (1981) :  
*Array detectors and excitation-emission matrices in multicomponent analysis* In : Modern fluorescence spectroscopy, Plenum Press, New York, 111.
- CLEVINGER T.E., HEMPHILL D.D., ROBERTS K., MULLINS W.A. (1983):  
*Chemical composition and possible mutagenicity of municipal sludges*. Journal WPCF, 55, 12, 1470.
- COLIN J.M., VION G. (1980) :  
*Protocole d'analyse par chromatographie en phase liquide et spectrofluorimétrie U.V. de traces d'hydrocarbures aromatiques polynucléaires dans les huiles blanches*, Analisis, 8, 224.
- COLIN J.M., VION G. (1981) :  
*Quantitative trace analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons by high-performance liquid chromatography and low-temperature fluorimetry in shpolskii matrices at 4.2°K*, J. of Chromatography, 204, 135.
- CONNEY A.H. (1982) :  
*Induction of microsomal enzymes by Foreign chemicals and carcinogenesis by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* : G.H.A. Clowes Memorial Lecture. Cancer research 42, 4887.
- CUBERES M.R., MARFIL C., BAYONA J.M., GRIMALT J., ALBAIGES J. (1984) :  
*Hidrocarburos aromaticos policiclicos : IV. Aislamiento y separacion en muestras ambientales*. Afinidad, XLI, 391, 227.
- CUENDET G. (1979) :  
*Etude du comportement alimentaire de la mouette rieuse*, Ph.D., Conservation de la Faune, Lausanne, Suisse.
- CUENDET G. (1984) :  
*Les lombriciens*, Institut de zoologie de l'Université de Neuchâtel, Suisse, document interne destiné aux travaux pratiques.
- CURL E., RODRIGUEZ-KABANA R., FUNDERBURK H. (1967)  
*Effect of dipyridyl and toluidine herbicides on growth response of sclerotium rolfsii in soil*. Phytopathology, 57, 7.

D

- DAVIS B.N.K. (1966):  
*Organochlorine insecticide residues in soil invertebrates.*  
Nature, 211, 1424.
- DAVIS B.N.K., HARRISON R.B. (1966):  
*Organochlorine insecticide residues in soil invertebrates.* Nature, 211, 1424.
- DAVIS B.N.K. (1968):  
*The soil macrofauna and organochlorine residues at twelve agricultural sites near Huntingdon.* Ann. Applied Biol., 61, 29.
- DAVIS B.N.K., FRENCH M.C. (1969):  
*The accumulation and loss of organochlorine insecticide residues by beetles, worms and slugs in sprayed fields.* Soil. Biol. Biochem., 1, 45.
- DAVIS B.N.K. (1971):  
*Laboratory studies on the uptake of dieldrin and DDT by earthworms.* Soil. Biol. Biochem., 3, 221.
- DAVIS T.S., PYLE J.L., SKILLINGS J.H., DANIELSON N.D. (1981) :  
*Uptake of Polychlorobiphenyls present in trace amounts from dried municipal sewage sludge through an old field ecosystem.* Bull. Environ. Contam. Toxicol., 27, 5, 689.
- DE ALENCASTRO L.F., PRELAZ V., TARRADELLAS J. (1984) :  
*Contamination of silos in switzerland by PCB residues in coatings,* Bull. Environ. Contam Toxicol., 33, 270.
- DE ALENCASTRO L.F., PRELAZ V., TARRADELLAS J. (1985) :  
*An improved quantitation method used to determine the origin of PCBs in wastewaters : the index of similarity,* Int. J. Env. Anal. Chem., 22, 183.
- DE ALENCASTRO L.F., TARRADELLAS J. (1983) :  
*Etude de la concentration en PCB des eaux usées dans les stations d'épuration,* Gas, Wasser und Abwasser, 3, 113.
- DE ALENCASTRO L.F., TARRADELLAS J. (1985) :  
*Source des PCB présents dans les eaux usées de trois villes de Suisse,* Mandat de recherche OFPE-OFES, "PCB dans les stations d'épuration, 3ème rapport, 52.
- DEAN R.B., SUESS M.J. (1985) :  
*The risk to health of chemicals in sewage sludge applied to land.* Waste management & Research 3, 251.

- DE HENAU H., MATTHIJS E., W.D. HOPPING (1986) :  
*Linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in sewage sludges, soils and sediments : analytical determination and environmental safety considerations.*, Int. J. Envir. Anal. Chem., 26, 279.
- DEMIRJIAN Y.A., JOSHI A.M., WESTMAN T.R. (1987) :  
*Fate of organic compounds in land application of contaminated municipal sludge*, Journal WPCF, 59, 32.
- DE WECK D., BORSINGER N., DIERCXSENS P., ROSSET B. (1981):  
*Etude préliminaire de la contamination des vers de terre par les PCB provenant de la valorisation agricole des déchets*, Mémoire, Programme 3ème cycle en protection de l'environnement, EPF-Lausanne, Suisse.
- D.F.I. (1984) :  
*Département Fédéral de l'Intérieur, Ordonnance sur les boues d'épuration*, No 814.225.23 du 8 avril 1981, Bern, Suisse.
- DIERCXSENS P., DE WECK D., BORSINGER N., ROSSET B., TARRADELLAS J. (1985) :  
*Earthworm contamination by PCBs and heavy metals*, Chemosphere, 14, 511.
- DIERCXSENS P., TARRADELLAS J. (1987a) :  
*Soil contamination by some organic micropollutants related to sewage sludge spreading*. Int. J. Env. Anal. Chem., 28, 143.
- DIERCXSENS P., WEGMANN M., DANIEL R., HAENI H., TARRADELLAS J. (1987b) :  
*Apport par les boues d'épuration de micropolluants organiques dans les sols et les cultures*, Gas, Wasser und Abwasser, 3, 123.
- DOELMAN P., HAANSTRA L. (1979) :  
*Effect of lead on soil respiration and dehydrogenase activity*. Soil Biol. Biochem., 11, 475.
- DOELMAN P., HAANSTRA L. (1984) :  
*Short-term and long-term effects of cadmium, chromium, copper, nickel, lead and zinc on soil microbial respiration in relation to abiotic soil factors*, Plant & Soil, 79, 317.
- DONARD O.F.X., RANDALL L., RAPSOMANIKIS S., WEBER J.H (1986) :  
*Developments in the speciation and determination of alkylmetals (Sn, Pb) using volatilization techniques and chromatography-atomic absorption spectroscopy*, Int. J. Env. Anal. Chem., 27, 55.

- DOXTADER K.G. (1968) :  
*Inhibition of microbial growth by phenylurea herbicides.*  
Bact. Proc., 4, 21.
- DOYLE R.C., KAUFMAN D.D., BURT G.W. (1978) :  
*Effect of dairy manure and sewage sludge on <sup>14</sup>C-pesticide degradation in soil.* J. Agric. Food Chem., 26, 4, 987.
- DUINKER J.C., HILLEBRAND M.T.J., PALMORK K.H. (1980) :  
*An evaluation of existing methods for quantitation of PCB in environmental samples,* Bull. Env. Contam. Toxicol., 25, 956.
- DUNN B.P., ARMOUR R.J. (1980) :  
*Sample extraction and purification for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by reversed-phase chromatography,* Anal. Chem., 52, 2027.
- DUVIGNEAUD P. (1974) :  
*La synthèse écologique,* Ed. DOIN, Paris, 123.

E
---

- EDWARDS C.A., THOMPSON A.R. (1973) :  
*Pesticides and the soil fauna.* Residue Revue, 45, 1.
- EDWARDS C.A. (1979) : *Tests to assess the effects of pesticides on beneficial soil organisms.* In: SCHMIDT E. (ed.), *Tests for the ecological effects of chemicals,* Springer-Verlag, Berlin, 249.
- EDWARDS N.T. (1983) :  
*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in terrestrial environment - a review.* J. of Environ. Qual., 12, 4, 427.
- EDWARDS P., KREIS B. (1985) :  
*Presence et cheminement de micropolluants organiques dans les peuplements lombriciens des agroecosystèmes.* Mémoire, Programme de 3ème cycle 1984/85, EPF-Lausanne.
- EISENREICH S.J., HOLLOD G.J., JOHNSON T.C. (1981) :  
*Atmospheric concentrations and deposition of Polychlorinated Biphenyls to lake superior.* In : "Atmospheric pollutants in natural waters" EISENREICH S.J. edit., Ann Arbor Sci. Pub., 425.

ELLWARDT P. (1976) :

*Variation in content of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in soil and plants by using municipal waste composts in agriculture. In : "Soil organic matter studies", proceedings of a symposium, Braunschweig, 6-10 sept. 1976, 291.*

EWALD M., LAMOTTE M., GARRIGUES P., RIMA J., VEYRES A., LAPOUYADE R. (1981) :

*Determination of Isomers of Monomethyl Phenanthrene extracted from Petroleum by Capillary Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry and by High Resolution Spectrofluorimetry in Alkane Crystals at a Temperature of 15 K. Adv. Org. Geochemistry, 705.*

F
---

FAIRBANKS B.C., O'CONNOR G.A. (1984) :

*Effects of sewage sludge on the adsorption of Polychlorinated Biphenyls by three New Mexico soils. J. Env. Qual., 13, 2, 297.*

FARRINGTON J.W. (1983) :

*Bivalves as sentinels of coastal chemical pollution : the mussel (and oyster) watch, Oceanus, 26, 18.*

FARRINGTON J.W. (1986) :

*Fossil fuel aromatic hydrocarbon biogeochemistry in the marine environment : research challenges, NATO ASI Series, vol. 69, In : "Strategies and advanced techniques for marine pollution studies : mediterranean sea", Edited by C.S. GIAM and H.J.-M. DOU, Springer-Verlag, Berlin.*

FARRINGTON J.W., GOLDBERG E.D., RISEBROUGH R.W., MARTIN J.H., BOWEN V.T. (1983) :

*U.S. "mussel watch" 1976-78 : An overview of the trace metal, DDE, PCB, hydrocarbon and artificial radionuclide data, Env. Sci. Technol., 17, 490.*

FARRINGTON J.W., RISEBROUGH R.W., PARKER P.L., DAVIS A.C., DE LAPPE B., WINTERS J.K., BOATWRIGHT D., FREW N.M. (1982) :  
*Hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and DDE in mussels and oysters from the U.S. coast, 1976-78, The mussel watch, Woods Hole Ocean. Inst. Tech. Rept., Woods Hole, U.S.A., 82.*

FARRINGTON J.W., WAKEHAM S.G., LIVRAMENTO J.B., TRIPP B.P., TEAL J.M. (1986) :

*Aromatic hydrocarbons in New-York bight polychaetes, ultraviolet fluorescence analyses and gas chromatography/gas-chromatography-mass-spectrometry analyses, Env. Sci. Technol., 20, 69.*

- FEDORAK P.M., WESTLAKE D.W.S. (1981)  
*Microbial degradation of aromatics and saturates in Prudhoe Bay crude oil as determined by glass capillary gas chromatography.* Can. J. Microbiol., 27, 432.
- FEILER H.D., STORCH P.J. (1980) :  
*Organics in municipal sludge, survey of forty cities.* In : "Municipal and industrial sludge utilization and disposal", proceedings of a symposium held at Washington , 28-30 may 1980, 53.
- FERRIERE G. (1980) :  
*Fonctions des lombriciens. VII : Une méthode d'analyse de la matière organique végétale ingérée.* Pedobiologia, 20, 263.
- FOCHT D.D. (1987) :  
*Ecological and evolutionary considerations on the metabolism of xenobiotic chemicals in soils,* American Soc. Agron., 50th year anniversary comm. found. Soil Sci. Soc. of America (to be published).
- FREEGARDE M., HATCHARD C.G., PARKER C.A. (1971) :  
*Oil spill at sea : its identification, determination and ultimate fate,* Lab. Pract., 20, 35.
- FRICKE C., CLARKSON C., LOMNITZ E., O'FARRELL T. (1985) :  
*Comparing priority pollutants in municipal sludges,* Bio-cycle, January/February, 35.
- FRIES G. (1982) :  
*Potential Polychlorinated Biphenyl residues in animal products from application of contaminated sewage sludge to land.* J. of Environ. Qual., 11, 1, 14.
- FRIES G., MARROW G.S (1984) :  
*Metabolism of chlorobiphenyls in soil.* Bull. Environ. Contam. Toxicol., 33, 1, 6.
- FURRER O.J., STADELMANN F.X., LEHMANN V. (1982) :  
*Die Wirkung steigender Gaben von Klärschlamm und Schweinegülle in Feldversuchen. I) Versuchsprogramm und Auswirkungen auf den Pflanzenenertrag.* Schweiz. Landw. Fo., 21, 3/4, 225.

G
---

- GARDNER W.S., LEE R.F., TENORE K.R., SMITH L.W. (1979) :  
*Degradation of selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in coastal sediments : importance of microbes and polychaete worms.* Water, air & soil pollut., 11, 339.

- GEORGII H.W., SCHMITT G. (1983) :  
*Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in precipitation.* In : "Precipitation scavenging, dry deposition and resuspension." Pruppacher edits., 395.
- GIAM C.S., ATLAS E., POWERS M.A., LEONARD J.E. (1984) :  
*Phthalic acid esters,* In : "The handbook of environmental chemistry", Ed. HUTZINGER O., vol 3, part C, 67.
- GIBSON D.T. (1983) :  
*Microbial degradation of hydrocarbons,* In : "chemistry and analysis of hydrocarbons in the environment, Eds. : ALBAIGES J, FREI R.W., MERIAN E., Gordon & Breach Sci. Publ., 177.
- GIGER W., BRUNNER P.H., AHEL M., Mc EVOY J., MARCOMINI A., SCHAFFNER C. (1987a):  
*Organische Waschmittelinhaltsstoffe und deren Abbauprodukte in Abwasser und Klärschlamm,* *Gaz, Wasser und Abwasser*, 3, 111.
- GIGER W., BRUNNER P.H., SCHAFFNER C. (1984) :  
*4-Nonylphenol in sewage sludge : accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants.* *Science*, 10, 225, 623.
- GIGER W., LEUENBERGER C., CZUZWA J., TREMP J. (1987b) :  
*Impuretés organiques en traces dans l'atmosphère : analyse, origine et comportement dans la pluie, la neige et le brouillard,* *Mitt./Nouv. EAWAG*, 23, 10.
- GIGER W., STEPHANOU E., SCHAFFNER C. (1981) :  
*Persistent organic chemicals in sewage effluents: I. identification of nonylphenols and nonylphenolethoxylates by glass capillary gas chromatography / mass spectrometry* *Chemosphere*, 10, 11/12, 1253.
- GISH C.D. (1970)  
*Organochlorine insecticide residues in soil invertebrates from agricultural lands.* *Pesticides Monitoring Journal*, 3, 241.
- GLATHE H., MAKAWI A.A.M. (1963) :  
*Über die wirkung von klärschlamm auf Boden und Mikroorganismen,* *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 110, 109.
- GORDON R.J. (1976) :  
*Distribution of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons throughout Los Angeles,* *Environ. Sci. & Technol.*, 10, 370.
- GOSWAMI K.P., KOCH B.L. (1976) :  
*A simple apparatus for measuring degradation of <sup>14</sup>C-labelled pesticides in soil. I : Metribuzin and glyphosate.* *Weed Res.*, 17, 77.

- GRIMMER G., BOHNKE H. (1972) :  
*Bestimmung des Gesamtgehaltes aller in Luftstaub and Kraftfahrzeugabgas mit des Capillar-gas-chromatografie*, Fresenius Z. Anal. Chem., 261, 310.
- GRIMMER G., BOHNKE H. (1975) :  
*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon profile analysis of high-protein foods, oils, and fats by gas chromatography*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 58, 725.
- GRIMMER G., BOHNKE H., BORWITZKY H. (1978) :  
*Gas-Chromatographische Profilanalyse der PAH in Klarschlammproblem*. Fresenius Z. Anal. Chem., 289, 91.
- GRIMMER G., GERNOT H., NIEMITZ W. (1980) :  
*Vergleich der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoff-profile von Klarschlammproben aus 25 Klaranlagen*. Vom Wasser, 54, 255.
- GRIMMER G. (1983) :  
*Environmental carcinogens : Polycyclic aromatic hydrocarbons, chemistry, occurrence, biochemistry, carcinogenicity*, CRC Press, 261 p.
- GROENEWEGER D., STOLP H. (1976) :  
*Microbial breakdown of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B, 162, 225.
- GUCKERT et al. (1968) :  
*Contribution à l'utilisation des techniques radioisotopiques pour l'étude de la matière organique de sol*. Bull. ENSAIA, 10, 69.
- GUCKERT A., NUSSBAUMER E., JACQUIN F. (1970)  
*Etude comparée de l'action du glucose  $^{14}\text{C}$  et de la paille  $^{14}\text{C}$  sur la stabilité structurale d'un sol limoneux acide*. Bull. de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Nancy, 12, 30.
- GUPTA K.G., SUD R.K., AGGARWAL P.K., AGGARWAL I.C. (1975)  
*Effect of Baygon (2-isopropoxyphenyl-N-methyl carbamates) on some soil biological processes and its degradation by a Pseudomonas sp.* Plant and soil, 42, 317.

H

- HAGENMAIER H., JAGER W. (1979) :  
*Neuere Ergebnisse der Bestimmung polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe in Trinkwasser-, Schlamm- und Sedimentproben mittels HPLC*. Vom Wasser, 53, 9.



- HAGENMAIER H., KAUT H., KRAUSS P. (1986) :  
*Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in sediments, sewage sludges and composts from municipal refuse by HPLC.* Intern. J. Environ. Anal. Chem., 23, 331.
- HAINES J.R., ATLAS R.M. (1982) :  
*In situ microbial degradation of Prudhoe Bay crude oil in Beaufort Sea sediments.* Mar. Environ. Res., 7, 91.
- HANKIN L., SAWHNEY B.L. (1984) :  
*Microbial degradation of Polychlorinated Biphenyls in soil.* Soil Science, 137, 6, 401.
- HANSCH C. (1980) :  
*The role of the partition coefficient in environmental toxicity,* In : "Dynamic, exposure and hazard of toxic chemicals", Ann Arbor Sci. Publ., Ann. Arbor, Michigan, U.S.A.
- HANUS J.P., GUERRERO H., BIEHL E.R., KENNER C.T. (1979) :  
*High pressure liquid chromatographic determination of PAH in oysters,* J. offic. assoc. anal. chem., 62, 29.
- HERBES S.E. (1981) :  
*Routes of microbial transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in water and sediments in the vicinity of a coal-coking wastewater discharge.* Applied & Environ. microbiol., 41, 1, 20.
- HERBES S.E., SCHWALL L.R. (1978) :  
*Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum-contaminated sediments.* Appl. Environ. Microbiol., 35, 306.
- HILPERT L.R., MAY W.E., WISE S.A., CHESLER S.N. (1978) :  
*Interlaboratory comparison of determinations of trace level petroleum hydrocarbons in marine sediments,* Anal. Chem. 50, 458.
- HITES R.A., BIEMANN W.G. (1975) :  
*Identification of specific organic compounds in a highly anoxic sediment by GCMS and HRMS.* Advances in Chem. series, 147, 188.
- HITES R.A., LAFLAMME R.E., FARRINGTON J.W. (1977) :  
*Sedimentary polycyclic aromatic hydrocarbons : the historical record,* Science 198, 829.
- HO C.N., CHRISTIAN G.D., DAVIDSON E.R. (1980) :  
*Application of the method of rank-annihilation to fluorescent multicomponent mixtures of polynuclear aromatic hydrocarbons,* Anal. Chem., 52, 1071.
- HOFFMANN, BONDINELL N.E., WYNDER E.L. (1974) :  
*Carcinogenicity of methylchrysenes,* Science, 183, 216.

- HOLT M.S., Mc KERRELL E.H., PERRY J., WATKINSON (1986) :  
*Determination of alkylphenol ethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection*, J. of Chromatography, 362, 419.
- HONSBERGER P., ROSSEL D. (1985) :  
*La bioaccumulation des PCB par la truite du Léman: état de contamination, approche expérimentale, application d'un modèle mathématique*, mémoire, 3ème cycle en protection de l'environnement, EPF-Lausanne, Suisse.
- HOPPER D.J. (1978) :  
*Microbial degradation of aromatic hydrocarbons*, In : "Developpements in biodegradation of hydrocarbons", Ed. WATKINSON R.J., Appl. Sci., London, 85.
- HOTAR Z., SULA J., KREMEN J., BRIZOVA E. (1979) :  
*Kancerogenni polcyklické aromatické uhlovodiky ve vyhnilych cistirenskych kalech*. Cas. Lek. Ceskych., 118, 4, 110.
- HUNT L.B., SACHO J. (1969) :  
*Response of robins to DDT and methoxychlor*. J. Wildlife Management, 33, 336.
- HUSSAROVA (1972) :  
*Microflora in the rhizosphere of maize : perennial effects of herbicides*. Weed abstr., 22, 3040.
- HUTZINGER O. (1974) :  
*The chemistry of PCB's*, CRC Press, Cleveland, Ohio, U.S.A.

I
---

- I.S.M. (1984) :  
*Institut Suisse de Météorologie, Valeurs journalières des précipitations*, 1er et 2ème trimestre 1984.

J
---

- JACOBS L.W., ZABIK M.J. (1983) :  
*Importance of sludge-borne organic chemicals for land application programs*, Proc. 6th annual Madison Conf. Appl. res. pract. munic. ind. waste, Wisconsin-U.S.A., 418.
- JAGGI W. (1976) :  
*Die Bestimmung der CO<sub>2</sub> Bildung als der Bodenbiologischen Aktivität*, Schweiz. Landw. Forschung, 15, 371.

- JEANROY E., GUILLET B., ORTIZ R. (1984) :  
*Application pédogénétiques de l'étude des formes du fer par les réactifs d'extraction : cas des sols brunifiés et podzolisés sur roches cristallines*, Science du sol, 3, 199.
- JENSEN S. (1972) :  
*The PCB story*, Ambio 1, 123.
- JOHNSON B.T., LULVES W. (1975)  
*Biodegradation of di-n-butyl phthalate and di-2-ethylhexyl phthalate in freshwater hydrosol*. J. Fish. Res. Board Can., 32, 333.
- K
- KARICKHOFF S.W. (1981) :  
*Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils*, Chemosphère, 10, 833.
- KATZ M. SAKUMA T., HO A. (1978) :  
*Chromatographic and spectral analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons, quantitative distribution in air of Ontario Cities*, Env. Sci. & Technol., 12, 909.
- KAWAMURA K., KAPLAN I.R. (1983):  
*Organic compounds in the rainwater of Los Angeles*, Environ. Sci. & Technol., 17, 497.
- KAWAMURA K., KAPLAN I.R. (1985):  
*Biogenic and anthropogenic organic compounds in rain and snow samples collected in southern California*, Atmos. Environment, 19, 1.
- KEARNEY P.C., KONTSON A. (1976) :  
*A simple system to simultaneously measure volatilization and metabolism of pesticides from soils*. J. Agric. Fd Chem., 24, 424.
- KILZER L., SCHEUNERT I., GEYER H., KLEIN W., KORTE F. (1970) :  
*Laboratory screening of the volatilization rates of organic chemicals from water and soil*, chemosphère, 8, 751.
- KIMBROUGH (1980) :  
*Halogenated biphenyls, terphenyls, naphtalenes, dibenzodioxins and related products*, Elsevier, North Holland biomedical press, 406 p.
- KNUTZEN J., SORTLAND B. (1982) :  
*Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in some algae and invertebrates from moderately polluted parts of the coast of Norway*, Water Research, 16, 421.

- KREIS B., EDWARDS P., CUENDET G., TARRADELLAS J. (1987):  
*The dynamics of PCBs in earthworm populations of agricultural soils. Pedobiologia (à paraître).*

L
---

- LAFLAMME R.E., HITES R.A. (1978) :  
*The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments, Geochim. Cosmochim. Acta, 42, 289.*
- LAY M.M., ILNICKI R.D. (1975) :  
*Effect of soil storage on propanil degradation. Weed Res. , 15, 63.*
- LEE M.L., NOVOTNY M., BARTLE K.D. (1976) :  
*GCMS and RMN derermination of PAH in airborne particulates, Anal. Chem., 48, 1566.*
- LEE M.L., NOVOTNY M., BARTLE K.D. (1981) :  
*Analytical chemistry of polycyclic aromatic compounds, Academic Press, London*
- LEE M.L., PRADO G.P., HOWARD J.B., HITES R.A. (1977) :  
*Source identification of urban airborne polycyclic aromatic hydrocarbons by GCMS and HRMS, Biomed. Mass Spectrom., 4, 182.*
- LEE R.F., GARDNER W.S., ANDERSON J.W., BLAYLOCK J.W. (1978) :  
*Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in controlled ecosystem enclosures. Environ. Sci. Technol., 12, 832.*
- LEE R.F., RYAN C. (1978) :  
*Microbial degradation op organochlorine compounds in estuarine waters and sediments. In : " Microbial degradation in polluted marine environment. Proc. Workshop 1978, pp. 443-450, 462-476, U.S. Environ. Prot. Agency, Off. Res. Dev., EPA - 600/9-79-012.*
- LEUENBERGER C., LIGOCKI M.P., PANKOW J.F. (1985) :  
*Trace organic compounds in rain. 4: Identities, concentrations, and scavenging mechanisms for phenol in urban air and rain., Envir. Sci. Technol., 19, 1053.*
- LORD K.A., BRIGGS G.G., NEALE M.C., MANLOVE R. (1980):  
*Uptake of pesticides from water and soil by earthworms. Pesticide science, 11, 401.*
- LUCKMAN W.H., DECKER G.C. (1960):  
*A 5-year report of observations in the Japanese beetle control area at Sheldon, Illinois. J. Econ. Entomol., 53, 821.*

- LUNDE G., GETHER J., GJØS N., STØBET LANDE M.B. (1977) :  
*Organic micropollutants in precipitation in Norway*,  
Atmosph. Environment, 11, 1007.
- LUNT D., EVANS W.C. (1970) :  
*The microbial metabolism of biphenyl*, Biochem. J., 118,  
54.

M
---

- MACKAY D., SHIU W.Y. (1977) :  
*Aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons*,  
J. Chem. Eng. Data, 22, 399.
- MAC RAE I.C., RAGHU K., CASTRO T.F. (1967) :  
*Persistence and biodegradation of four common isomers of  
benzene hexachloride in submerged soils*. J. Agric. Food  
Chem., 15, 911.
- MAIRE N. (1983) :  
*Contribution à l'étude de la biomasse des sols et de son  
activité, par des méthodes biologiques globales*, thèse No  
489, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne.
- MARCH J.A.P., DAVIES H.A. (1978) :  
*The effect of herbicides on respiration and transformation  
of nitrogen in two soils, III : Lenacil, terbacil,  
chlorthiamid and 2,4,5-T*, Weed Research, 18, 57.
- MARCH J.A.P., DAVIES H.A., GROSSBARD E. (1977) :  
*The effect of herbicides on respiration and transformation  
of nitrogen in two soils, I : Metribuzin and glyphosate*.  
Weed Res., 17, 77.
- MARCH J.A.P., DAVIES H.A., GROSSBARD E. (1977) :  
*The effect of a single field application of very high  
rates of linuron and simazine on carbon dioxide evolution  
and transformation of nitrogen within soil*. Proc. 12th Br.  
Weed Control Conf., 53.
- MARINUCCI A., BARTHA R. (1979) :  
*Apparatus for monitoring the mineralization of volatile  
14C-labelled compounds*. Appl. Env. Microbiol., 38, 1020.
- MARQUENIE J.M., SIMMERS J.W. (1984):  
*Bioavailability of heavy metals, PCBs & PAH components to  
the earthworm Eisenia Foetida*. Proc. Int. Conf. on  
Environmental Contamination, London, July 1984, 318.

- Mc EVOY J., GIGER W. (1985) :  
*Accumulation of linear alkylbenzenesulphonate surfactants in sewage sludges*, *Naturwissenschaften*, 72, 429.
- Mc INTYRE A.E., PERRY R., LESTER J.N. (1981) :  
*Analysis of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in sewage sludges*. *Anal. letters*, 14, 291.
- MILL T. (1980) :  
*Data needed to predict the environmental fate of organic chemicals*, In : "Dynamics, exposure and hazard assessment of toxic chemicals", A. HAQUE Ed., Ann Arbor, Michigan, 323.
- MILLE G., CHEN J.Y., DOU H.J.M. (1982) :  
*Polycyclic aromatic hydrocarbons in mediterranean coastal sediments*. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 11, 295.
- MITTERER M., BAYER H., SCHINNER F. (1981) :  
*Der Einfluss von Fungiziden auf die mikrobielle Aktivität eines Bodens*. *F. Pflanzenernähr. Bodenkd.*, 144, 463.
- MONOD G. (1983) :  
*Etude de la contamination chimique du lac Léman par les résidus organochlorés : Polychlorobiphényles et DDT*. Thèse, laboratoire de pharmacie-toxicologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 15.
- MONTGOMERY M.L., cité par TINSLEY J. (1979) :  
*Chemical concepts in pollutant behavior*, Wiley Interscience, New-York, 153.
- MOREL J.L. (1977) :  
*Contribution à l'étude des boues résiduaires dans le sol*. Thèse à l'université de Nancy 7. No IFLA : 267861
- MURPHY P.G. (1972) :  
*Sulfuric acid for the cleanup of animal tissues for analysis of acid-stable chlorinated hydrocarbon residues*. *J. of Amer. Off. Anal. Chem.*, 55, 1360.

N
---

- NAYLOR L.M., LOEHR R.C. (1982a) :  
*Priority pollutants in municipal sewage sludge, Part 1*. *Bio Cycle*, july-august 1982, 18.
- NAYLOR L.M., LOEHR R.C. (1982b) :  
*Priority pollutants in municipal sewage sludge, Part 2*. *Bio Cycle*, november - december 1982, 37.

- NEUHAUSER E.F., LOEHR R.C., MALECKI M.R., MILLIGAN D.L., DURKIN P.R. (1985):  
*The toxicity of selected organic chemicals to the Earthworm Eisenia Foetida.* J. Env. Qual., 14, 383.
- NICOLARDOT B., GUIRAUD G., CHAUSSOD R., CATROUX G. (1986) :  
*Minéralisation dans le sol de matériaux microbiens marqués au carbone 14 et à l'azote 15 : quantification de l'azote de la biomasse microbienne,* Soil. Biol. Biochem., 18, 263.
- NIKOLAOU K., MASCLLET P., MOUVIER G. (1984) :  
*Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere, a critical review,* The Sci. of Total Env., 32, 103.
- NOORT P.C.M., WONDERGEM E. (1985) :  
*Scavenging of airborne PAH by rain,* Environ. Sci. Technol., 19, 1044.
- O
- O'CONNOR G.A., FAIRBANKS B.C., DOYLE E.A. (1981) :  
*Effects of sewage sludge on Phenoxy herbicide adsorption and degradation in soils.* J. Env. Qual., 10, 4, 510.
- OECD (1981a) :  
*OECD Chemical Testing Programme, UPEC/2 Guidelines for assessing the toxicity of chemicals to soil microorganisms : nitrogen cycle.* Ecotoxicology Group, Fourth draft, Dec. 1, 1981.
- OECD (1981b) :  
*OECD Chemical Testing Programme , UPEC/3 Guidelines for assessing the toxicity of chemicals to soil microorganisms : carbon cycle.* Ecotoxicology Group, Fourth draft, Dec. 1, 1981.
- OFPE (1983) :  
*Epuration des eaux usées et qualité des eaux de surface,* Les cahiers de l'environnement No 20, Office fédéral de la protection de l'environnement, Bern, Suisse.
- OGAN K., KATZ E., SLAVIN W. (1979) :  
*Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples by reversed-phase liquid chromatography,* Anal. Chem., 51, p. 1315-1320

OVERCASH M.R. (1984) :

*Land treatment of municipal effluent and sludge : specific organic compounds.* In : "Utilization of municipal wastewater and sludge on land" PAGE A.L. & all. edits. Proceedings of the 1983 Workshop, E.P.A.-600/9-84-003.

P

PAL D., WEBER J.B., OVERCASH M.R. (1980) :

*Fate of polychlorinated biphenyls (PCB's) in soil-plant systems,* Residue Rev., vol. 74, 45.

PANKOW J.F., ISABELLE L.M., ASHER W.E (1984) :

*Trace organic compounds in rain. 1.: Sampler design and analysis by adsorption thermal desorption (ATD),* Environ. Sci. Technol., 18, 310.

PARR J.F., REUSER H.W. (1962) :

*Organic matter decomposition as influenced by oxygen level and flow rate of gases in the constant aeration method.* Soil. Sci. Soc. Amer. Proc., 26, 552.

PARR J.F., SMITH S. (1969) :

*A multipurpose manifold assembly : use in evaluating microbiological effects of pesticides.* Soil. Sci., 107, 271.

PEAKALL D.B. (1975) :

*Phthalate esters : Occurrence and biological effects.* Residue Review, 54, 1.

PINTO A.C., MININNI G., SANTORI M. (1983) :

*Economics of sludge processing.* In : "Processing and use of sewage sludge" P. L'HERMITE, H. OTT edits., Commission of the european communities, proceedings third int. symp. Brighton, U.K., 27-30 sept. 1983

PRAMER D., BARTHA R. (1972) :

*Preparation and processing of soil samples for biodegradation studies.* Environ. Letters, 2, 217.

Q

QUAGHEBEUR D., DE WULF E., RAVELINGEN M.C. (1983) :

*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in rainwater.* The Sci. of total Env., 32, 35.



R

- RADDING S.B., MILL T., GOULD C.W., LIU D.H., JOHNSON H.L.,  
BOMBERGER D.C., FOJO C.U. (1976) :  
*The environmental fate of selected polynuclear aromatic hydrocarbons*, EPA 560/5-75-009, PB 250 948 U.S. OTS, Washington D.C., U.S.A.
- RAW F. (1959) :  
*Estimating earthworm population by using formalin*, Nature, 21, 1661.
- REINECKE A.J., NASH R.G. (1984) :  
*Toxicity of 2,3,7,8-TCDD and short-term bioaccumulation by earthworms (oligochaeta)*. Soil. Biol. Biochem., 16, 45.
- RHETT R.G., SIMMERS J.S., LEE C.R. (1984) :  
*Eisenia Foetida used as a biomonitoring tool to predict the potential bioaccumulation of contaminants from contaminated dredged material*. Proc. Int. Conf. on Earthworms in Waste and Environmental Management. Queens' College, Cambridge, 23-27 July 1984, 61.
- RHO J.H., STUART J.L. (1978) :  
*Automated tree-dimensional plotter for fluorescence measurements*, Anal. Chem, 50, 620.
- RHYS WILLIAMS A.T. (1980) :  
*Fluorescence detection in liquid chromatography*, Perkin-Elmer, Beaconsfield, U.K.
- RISEBROUGH R., HUGGETT R.J., GRIFFIN J.J., GOLDBERG E.D. (1968) :  
*Transatlantic movements in the northeast trades*, Science 156, 1233.
- RODRIGUEZ C.F., Mc MAHON W.A., THOMAS R.E. (1980) :  
*Method development for determination of polychlorinated hydrocarbons in municipal sludge*, Technical report data EPA 600/2-80-029.
- ROGERS J.E., LI S.W. (1985) :  
*Effect of metals and other inorganic ions on soil microbial activity : soil dehydrogenase assay as a simple toxicity test*, Bull. Environ. Contam. Toxicol, 34, 858.
- ROTHER J.A., MILLBANK J.W., THORNTON I. (1982) :  
*Effects of heavy-metal additions on ammonification and nitrification in soils contaminated with cadmium, lead and zinc*, Plant and Soil, 69, 239.

- ROUELLE J. (1982) :  
*Microorganismes et alimentation des vers de terre.* Bull. Cent. étud. rech. sci., Biarritz, 14, 173.
- RUSSELL D.J., Mc DUFFIE B. (1983) :  
*Analysis for phthalate esters in environmental samples : separation from PCB's and pesticides using dual column liquid chromatography,* Int. J. Env. Anal. Chem., 15, 165.
- S
- SAEGER V.W., TUCKER E.S. (1976) :  
*Biodegradation of Phthalic Acid Esters in river water and activated sludge.* Applied & Env. Microbiol., 31, 1, 29.
- SAFE S., SAFE L., MULLIN M. (1985) :  
*PCB's : congener-specific analysis of a commercial mixture and a human milk extract,* J. Agr. Food Chem., 33, 24.
- SCHARPENSEEL H.W., THENG B.K.G., STEPHAN S. (1978)  
*Polychlorinated biphenyls (14C) in soils : adsorption, infiltration, translocation and décomposition.* Env. Biogeochem. Geomicrob., 2, 619.
- SCHERRER B. (1984) :  
*Biostatistique,* Ed.: Gaëtan Morin, Québec, Canada.
- SCHEUNERT I. (1985) :  
*Sediments.* In : "Appraisal of tests to predict the Environmental behaviour of chemicals." Eds.: SHEEHAN P., KORTE F., KLEIN W., BOURDEAU P., Scope 25, p. 155, John Wiley & sons, New York
- SCHINNER F., BAYER H., MITTERER M. (1983) :  
*The influence of herbicides on microbial activity in soil materials,* Die Bodenkultur, 34, 22.
- SCHMITT G. (1982) :  
*Seasonal and regional distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in precipitation in the Rhein-Main-area.* In : "Deposition of Atmospheric Pollutants" H.W. GEORGII & J. PANKRATH edits., 133.
- SEBA D.B., PROSPERO J.M. (1971) :  
*Pesticides in the lower atmosphere of the northern equatorial Atlantic Ocean,* Atmos. Environ., 5, 1043.

- SHABAD L.M., KHESINA A.Y., SCUBAK H.P., SMIRNOV G.A. (1969) :  
*The carcinogenic hydrocarbon benzo(a)pyrene in the soil.*  
J. Nat. Cancer Inst., 47, 1179.
- SIEGFRIED AGRO (1986) :  
*Guides de traitement, catalogue commercial de la firme*  
Siegfried Agro, Zofingen, Suisse.
- SIMON L. (1971) :  
*Effects of herbicides on microorganisms.* Folia Microbiol.,  
16, 516.
- SIMONEIT B.R.T. (1985) :  
*Application of molecular marker analysis to vehicular*  
*exhaust for source reconciliations,* Intern. J. Env. Anal.  
Chem., 22, 203.
- SIMS R.C., OVERCASH M.R. (1983) :  
*Fate of polynuclear aromatic compounds in soil-plant*  
*system.* Residue Reviews, 88, 2.
- SKLAREW D.S., GIRVIN D.C. (1987) :  
*Attenuation of polychlorinated biphenyls in soils,* Reviews  
of Env. Contam. Toxicol. (formerly Residue Reviews), 98, 1.
- SMITH R.D. (1979) :  
*Formation of radicals and complex organic compounds by*  
*high-temperature pyrolysis : the pyrolysis of toluene,*  
*Combustion and flame,* 35, 179.
- SOLANAS A.M., PARES R., BAYONA J.M., ALBAIGES J. (1984)  
*Degradation of aromatic petroleum hydrocarbons by pure*  
*microbial cultures,* Chemosphere, 13, 593.
- STADELMANN F.X. (1982) :  
*Die Wirkung steigender Gaben von Klärschlamm und*  
*Schweinegülle in Feldversuchen.* Schweiz. Landw. Fo., 21,  
3/4, 239.
- STADELMANN F.X., FURRER O.J. (1984) :  
*Long-Term effects of sewage sludge and pig slurry*  
*applications on microbiological and chemical soil*  
*properties in field experiments.* In : "Long-term effects  
of sewage sludge and farm slurries applications." Elsevier  
Appl. Sci. Publ., 136.
- STEIDLER F. (1986) :  
*A program package for interpolation and plotting of*  
*digital height models,* Bildmessung und Luftbildwesen, 54,  
pp. 5.
- STEPHANOU E., GIGER W. (1982) :  
*Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2.:*  
*Quantitative determinations of nonylphenols and*  
*nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas*  
*chromatography,* Environ. Sci. Technol., 16, 800.

- STRACHAN W.M., HUNEALUT H. (1979) :  
*Polychlorinated Biphenyls and organochlorine pesticides in great lakes precipitation.* J. Great Lakes Res., 5, 1, 61.
- STRACHAN W.M., HUNEALUT H. , SCHERTZER W.M., ELDER F.C. (1980) :  
*Organochlorines in precipitations in the Great Lakes region,* In : Hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in the aquatic environment, Ed.: AFGAN B.K., MACKAY D., Plenum Press, New York, 387.
- STRINGER A., PICKARD J.A. (1963) :  
*The DDT content of soil and earthworms in an apple orchard at Long Ashton.* Rept. Agr. Hort. Research Station Univ. Bristol, 127.
- SUBRAMANIAN B.R., SHINSUKE T., HIDAKA H., TATSUKAWA R. (1983) :  
*DDTs and PCB isomers and congeners in Antarctic fish,* Arch. Environ. Contam. Toxicol., 12, 621.
- SUESS A. (1980) :  
*Grundsatzfragen zur Losung von Umweltproblemen.* Bayer. Landanst. Bodenk. Pflanzenb., 57, 376.
- SWAIN W.R (1978) :  
*Chlorinated organic residues in fish, water and précipitations from the vicinity of Isle Royale, Lake Superior,* J. Great Lakes Research, 4, 398.
- T
- TALMI Y., BAKER D.C. (1978) :  
*Fluorescence spectrometry with optoelectronic image detectors,* Anal. Chem., 50, 936A.
- TARRADELLAS J. (1984) :  
*Ecologie des micropolluants,* Monographie d'écologie des polluants 1, EPF-Lausanne, Suisse, 77.
- TARRADELLAS J., DIERCXSENS P. (1983) :  
*Les micro-polluants organiques dans les boues d'épuration,* Schweiz. Arch. Tierheilk., 125, 589-605.
- TARRADELLAS J., DIERCXSENS P., BOUCHE M.B. (1982) :  
*Methods of extraction and analysis of PCBs from earthworms,* Int. J. Environ. Anal. Chem., 13, 55-67.
- TEAL J.M., BURNS K., FARRINGTON J. (1978) :  
*Analyses of Aromatic Hydrocarbons in Intertidal Sediments Resulting from Two Spills of No. 2 Fuel Oil Buzzards Bay, Massachusetts.* J. Fish. Res. Board Can., 35, 510.
- THIBODEAUX L.J. (1981) :  
*Estimating the air emissions of chemicals from hazardous waste landfills.* J. Hazard. Mater., 4, 235.

- TOMINGAS R. (1979) :  
*Remarks on the sampling procedures for PAH from the atmosphere*, Fresenius Z. Anal. Chem., 297, 97.
- TOMINGAS R., VOLTMER G., BEDNARIK R. (1977) :  
*Direct fluorometric analysis of aromatic polycyclic hydrocarbons on thin layer chromatograms*, The Sci. of Total Env., 7, 261.
- TOMLIN A.D., GORE F.L. (1974) :  
*Effects of six insecticides and a fungicide on the numbers and biomass of earthworms in pasture*. Bull. Env. Contam. Toxicol., 12, 487.
- TROCME M. (1985) :  
*Persistence et biotoxicité du Nonylphénol : Etude in vitro dans un système compost-support minéral*. Travail de 3ième cycle en protection de l'environnement, EPFL, Lausanne (Suisse).

V

- VAN RHEE J.A. (1977)  
*Effects of soil pollution on earthworms*. Pedobiologia, 17, 201.
- VAN SCHREVEN D.A., LINDENBERGH D.J., KORINDON A. (1970) :  
*Effect of several herbicides on bacterial populations and activity and the persistence of these herbicides in soils*. Plant and Soil, 33, 513.
- VARANKA M.W., ZABLOCKI Z.M., HINESLY T.P. (1976) :  
*The effect of digested sludge on soil biological activity*. J. WPCF, 48, 1728.
- VILLENEUVE J.P., HOLM E. (1984) :  
*Atmospheric background of chlorinated hydrocarbons studied in swedish lichens*, Chemosphere, 13, 1133.
- VOLKMAN J.K., ALEXANDER R., KAGI R.I., ROWLAND S.J., SHEPPARD N. (1984) :  
*Biodegradation of aromatic hydrocarbons in crude oils from the Barrow sub-bassin of western Australia*, Org. Geochemistry, 6, 619.

W

- WAKEHAM S.G., SCHAFFNER C., GIGER (1980a) :  
*Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments, I. Compounds having anthropogenic origins*, Geochim. et Cosmochim. Acta, 44, 403.

- WAKEHAM S.G., SCHAFFNER C., GIGER (1980b) :  
*Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments, II. Compounds derived from biogenic precursors during early diagenesis*, *Geochim et Cosmochim. Acta*, 44, 415.
- WALTER B. (1970) :  
*Effects of various herbicides on structure and microbiology of the soil*. *Sonderh. Z. PflKrankh. PflPath. PflSchutz*, 5, 29.
- WANDRUSZKA R.M.A., BRANTLEY S. (1979) :  
*A fluorescence polarization study of polyaromatic hydrocarbons adsorbed on colloidal kaolin*, *Anal. Letters*, 12, 1111.
- WARNER I.M., CHRISTIAN G.D., DAVIDSON E.R., CALLIS J.B. (1977) :  
*Analysis of multicomponent fluorescence data*, *Anal. Chem.*, 49, 564.
- WARNER I.M., DAVIDSON E.R., CHRISTIAN G.D. (1977) :  
*Quantitative analysis of multicomponent fluorescence data by the method of least squares and non-negative least sum errors*, *Anal. Chem.*, 49, 2155.
- WATSON J.R (1977) :  
*Seasonal variation in the biodegradation of 2,4-D in river water*, *Water res.*, 11, 153.
- WEAST R.C. (1980) :  
*CRC Handbook of chemistry and physics*, CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- WEBER G. (1961) :  
*Enumeration of components in complex systems by fluorescence spectrophotometry*, *Nature*, 4770, 27.
- WHEATLEY G.A., HARDMAN J.A. (1968) :  
*Organochlorine insecticide residues in earthworms from arable soils*. *J. Sci. Food Agric.*, 19, 219.
- WIRZ (1986) :  
*Lanwirtschaftliches Handbüchlein*, Verlag Wirz, Aarau, 33.
- WISE S.A., CHESLER S.N., HERTZ H.S., HILPERT L.R., MAY W.E. (1977) :  
*Chemically-Bonded Aminosilane Stationary Phase for the High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Polynuclear Aromatic Compounds*. *Anal. Chem.*, 49, 2306.

Y

- YADAV D.V., PILLAI M.K.K., AGARWAL H.C. (1976) :  
*Uptake and metabolism of DDT and lindane by the Earthworm Pheretima Posthuma*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 16, 541.
- YAMASAKI H., KUWATA K., MIYAMOTO H. (1982) :  
*Effects of ambient temperature on aspects of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons*, Envir. Sci. Technol., 16, 189.
- YOUNGBLOOD W.W., BLUMER M. (1975) :  
*Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: homologous series in soils and recent marine sediments.*, Geochim. et Cosmochim. Acta, 39, 1303.

Z

- ZANDER M. (1980) :  
*Polycyclic aromatic hydrocarbons*, In : "Environmental chemistry", Ed. O. HUTZINGER, Part 3A, Anthropogenic compounds, 109.
- ZEPP R.G. (1980) :  
*Assessing the photochemistry of organic pollutants in aquatic environments*, In : "Dynamic, exposure and hazard assessment of toxic chemicals", Ed. A. HAQUE, Ann Arbor Sci. Publ., Michigan, U.S.A.
- ZINGG M. (1985) :  
*Ausmass und Ursache des Belastung schweizerischer Oberflächengewässer mit zinnorganischen Verbindungen*, Raport Institut für Toxikologie, ETH-Zürich, im Auftrag des Bundesamtes für Umweltschutz.
-





## **ANNEXES**



## **ANNEXE 1**

### **La conservation des échantillons.**

*Le but de ce court chapitre est de montrer l'importance d'une conservation adéquate des échantillons desquels on devra extraire et analyser les micropolluants organiques, en particulier les PAH.*

#### **1) INTRODUCTION.**

Lorsqu'un chercheur doit effectuer une étude sur la contamination d'un sol par des micropolluants organiques il doit souvent, à un moment précis de sa recherche, prélever plusieurs dizaines d'échantillons de sol pendant la même journée. Dans le cas des PAH les procédures d'extraction et de purification des échantillons prennent deux journées pour 6 échantillons. Si une technique de conservation adéquate des échantillons n'est pas adoptée, les derniers échantillons analysés auront eu tout le temps de voir se dégrader une partie des PAH qu'ils contiennent. La littérature scientifique est en général très peu claire sur les techniques de conservation des échantillons et en particulier en ce qui concerne celles qui visent à conserver convenablement les PAH. Nous avons donc décidé d'effectuer un test de conservation d'échantillons sur une période de 8 mois.

#### **2) LA CONCEPTION DU TEST.**

En premier lieu il nous a fallu choisir le substrat sur lequel appliquer notre test de conservation. Deux types d'échantillons étaient tout indiqués : un échantillon de sol ou un échantillon de boue d'épuration. En effet, c'étaient de loin les deux types d'échantillons sur lesquels nous étions amenés à effectuer le plus d'analyses de PAH. Finalement notre choix s'est porté vers un échantillon de boue d'épuration car souvent les concentrations en PAH que l'on y détecte sont bien plus importantes que celles des sols. Le test y gagnerait certainement en précision analytique.

Nous avons prélevé un échantillon assez important de boue d'épuration auquel nous avons appliqué les techniques habituelles d'extraction et de purification afin d'analyser les PAH. Mais à chaque étape de l'analyse nous avons conservé une partie de l'échantillon traité tel quel. Le restant de la procédure analytique serait effectué lors de la quantification finale en PAH de l'échantillon. Nous disposions ainsi d'une série d'échantillons plus ou moins évolués dans la procédure analytique. Nous espérons ainsi pouvoir déterminer sous quelle forme les échantillons conservent le mieux leurs PAH durant une longue période. Les échantillons furent conservés sous 6 formes. Leurs dénominations ainsi qu'une échelle d'évolution analytique sont représentées sur la figure 68.

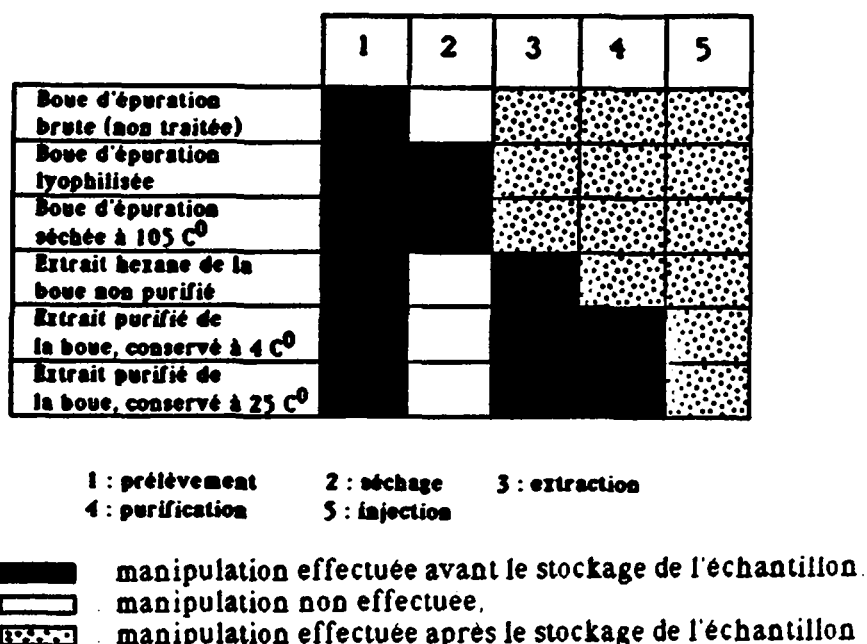


Figure 68: Les 6 formes de conservation des échantillons et leur degré d'avancement dans la procédure analytique.

Quelques détails au sujet des six formes de conservation suivent à présent :

La boue brute: C'est une boue digérée primaire de la station d'épuration de Morges. Elle est déshydratée par pression pour contenir  $\pm 40\%$  de matières sèches. Ce type de boue a été choisi car des quantités assez importantes de matières sèches sont nécessaires pour les analyses. Six portions de boue ont été réparties dans des béciers et pesées avec précision car le taux d'humidité de ces boues peut varier durant les 8 mois que dure le test. Les portions sont conservées au frigo à 4°C et à l'abri de toute lumière.

La boue lyophilisée: Dès son arrivée au laboratoire une partie de la boue brute est lyophilisée. Le lyophilisat est recueilli, tamisé à 1 mm et homogénéisé par agitation mécanique durant 1 heure. La poudre est ensuite stockée au frigo à 4°C et à l'abri de toute lumière.

La boue séchée à 105°C: De même que pour la lyophilisation, une partie de la boue brute est séchée à 105°C et tamisée à 1 mm. La poudre obtenue est aussi conservée au frigo à 4°C et à l'abri de toute lumière.

L'extrait non purifié de boue: On extrait les polluants d'une portion de la boue brute selon la procédure de la fiche analytique No 1 en annexe de ce travail. L'extrait hexane est conservé tel quel au frigo à 4°C et à l'abri de toute lumière. A chaque stade du test de conservation et après une agitation magnétique de 1 heure, une aliquote de cette phase hexane est prélevée en vue de poursuivre l'analyse et de quantifier les PAH.

Les extraits purifiés de boue: Pour le dernier lot de boue brute, les procédures d'extraction et de purification sont menées à leur terme selon les fiches analytiques 1 et 4. Un extrait purifié est conservé à 4°C et un autre à température ambiante. Les deux extraits sont conditionnés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et sont conservés à l'abri de la lumière.

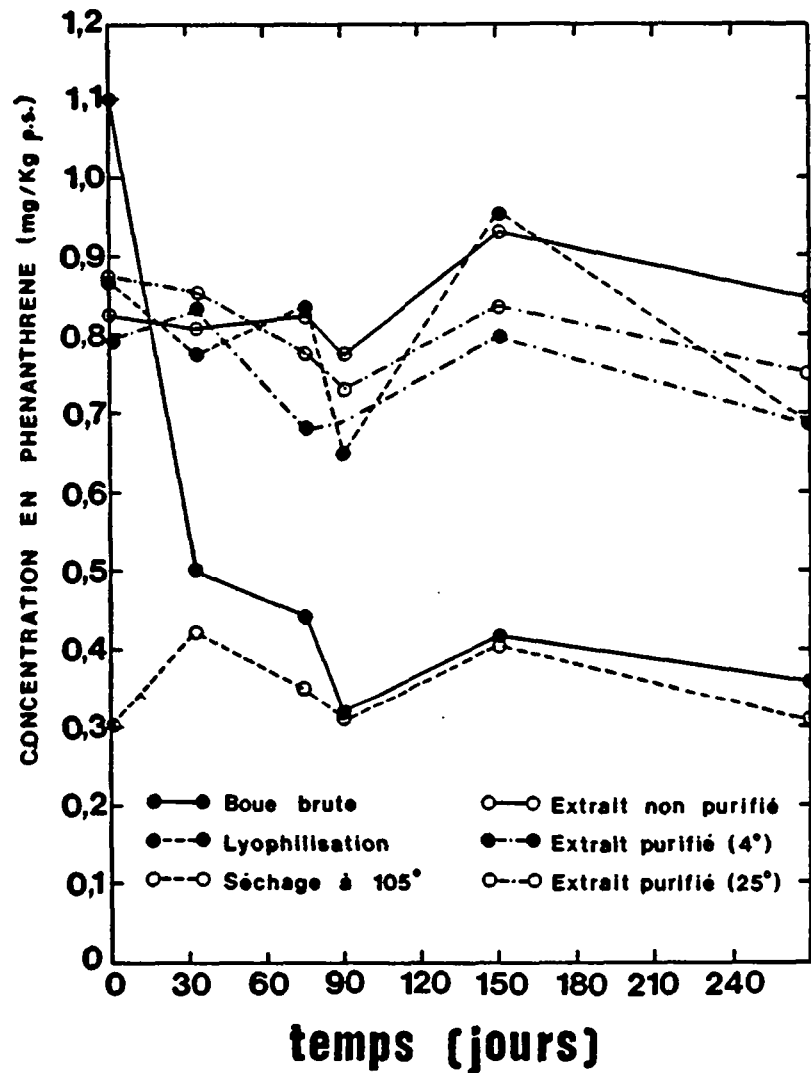


Figure 69: comportement du phénanthrène d'un échantillon de boue d'épuration soumis à 6 méthodes de conservation différentes.

Les dates des analyses des six types d'échantillons sont les suivantes :

- Prélèvement de la boue et première analyse : 09/07/1985
- Seconde analyse : 14/08/1985
- Troisième analyse : 26/09/1985
- Quatrième analyse : 09/10/1985
- Cinquième analyse : 09/12/1985
- Sixième analyse : 08/04/1986

### 3) RESULTATS ET DISCUSSION.

La figure 69 montre les résultats obtenus pour le phénanthrène. Elle montre que deux méthodes de conservation des échantillons sont à rejeter d'emblée : la conservation de la boue sous forme brute et celle après un séchage à 105° C. La boue brute perd plus de la moitié de son phénanthrène en un mois de temps; ceci est vraisemblablement dû aux activités bactériennes de la boue. Le séchage de la boue à 105° C est désastreux car il diminue de plus de 70% la teneur en phénanthrène de la boue brute de départ. Cette perte se crée probablement par volatilisation pure et simple du PAH. Ces deux observations sont valables également pour les autres PAH étudiés dans ce travail, tout en remarquant cependant une atténuation des deux phénomènes en fonction de l'augmentation du nombre de cycles des PAH.

Trois méthodes de conservation des échantillons semblent assez bonnes : la conservation après lyophilisation, celle sous forme d'extrait hexane non purifié et celle sous forme d'extrait DMSO purifié. Dans ce dernier cas la température ne semble pas jouer de rôle important dans la conservation des PAH, du moins en ce qui concerne les deux températures testées : 4 et 25 °C.

Nous observons tout de même qu'aucune des trois méthodes précédentes n'atteint la concentration maximale de 1,1 mg/kg P.S. de phénanthrène obtenue lors d'une analyse effectuée immédiatement après le prélèvement de la boue.

Suite à ce test de conservation nous avons conclu que la lyophilisation était une des meilleures méthodes de préparation des échantillons avant leur conservation pour une période plus ou moins longue. Les autres méthodes prennent soit trop de temps, soit détruisent les PAH des échantillons.

---

## **ANNEXE 2**

### **Les techniques analytiques.**

*Les techniques analytiques utilisées durant ce travail de recherche sont rassemblées dans le présent chapitre. Une attention toute particulière est portée aux techniques analytiques concernant les PAH car c'est la première fois qu'elles ont été utilisées au laboratoire d'écotoxicologie de l'EPFL. Ces techniques sont établies sous forme de fiches numérotées auxquelles ce travail de recherche fait souvent référence. Ces fiches analytiques sont subdivisées en 4 groupes que voici :*

- 1) Les techniques d'extraction des micropolluants,
- 2) Les techniques de purification des extraits,
- 3) La réalisation des standards,
- 4) Les techniques instrumentales d'analyse.

#### 1) LES TECHNIQUES D'EXTRACTION DES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES.

Fiche analytique No 1 : Extraction simultanée des hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH) et des polychlorobiphényles (PCB) de tous les types d'échantillons de l'écosystème terrestre, à l'exception des échantillons d'eau de pluie.

Références principales : Grimmer et al. 1975 et 1978, Hanus et al. 1979, Hilpert et al. 1978, Knutzen et al. 1982.

#### **Matériel**

- 1 lyophilisateur (Secfroid, Minilyo I, 3002).
- 1 système de chauffage à reflux avec un condenseur Liebig.
- 2 ballons rodés de 250 ml.
- 1 cylindre gradué de 100 ml.
- 2 béchers de 400 ml.

#### **Réactifs**

(Quantités nécessaires par échantillon à extraire)

- méthanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , Merck) : 100  $\text{cm}^3$
- hydroxyde de potassium (KOH, Merck) : 11g
- n-hexane ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , Malinckrodt) : 90-150  $\text{cm}^3$

#### **Procédure**

Les échantillons de sol et de boues sont lyophilisés dans la mesure du possible. Environ 10g d'échantillon sec sont introduits dans un ballon de 250 ml. On y ajoute 100  $\text{cm}^3$  de méthanol dans lequel on a préalablement dissous 2N de KOH. On fait bouillir légèrement ce mélange à reflux pendant deux heures. On laisse refroidir le tout. On rince les parois internes du refroidisseur avec un peu de méthanol pur. On introduit la partie liquide de

l'échantillon dans le ballon à décanter. On introduit ensuite 30 à 50 ml d'hexane dans le ballon de 250 ml où par agitation on extrait les polluants de la partie solide de l'échantillon. On transvase ensuite l'hexane dans le ballon à décanter pour extraire cette fois les polluants de la partie liquide de l'échantillon. On répète la procédure à 3 reprises.

#### Critique de la méthode

Cette méthode possède deux avantages importants :

Premièrement, par saponification les graisses contenues dans l'échantillon acquièrent des groupements fonctionnels hydrophiles qui rendent ces molécules solubles dans une phase aqueuse. Cette sorte de première purification empêche ces graisses de passer dans la phase organique lors de l'extraction des micropolluants organiques en ampoule à décanter.

Deuxièmement, cette méthode d'extraction ne forme presque jamais d'émulsions, ce qui évite une étape supplémentaire de centrifugation.

Le désavantage de cette méthode réside dans un taux de récupération moyen pour ces deux familles de micropolluants organiques :  $\pm 80 \%$ .

---



Fiche analytique No 2 : Extraction simultanée des PAH, PCB et phtalates d'échantillons d'eau de pluie.
--

Références principales : Acheson et al. (1976), Caragay et al. (1979), De Alencastro et al. (1983)

### Matériel

- 1 ballon à fond plat de 2 litres,
- 1 agitateur magnétique,
- 1 barreau aimanté,
- 1 ballon rodé de 250 ml,
- 1 ampoule à décanter de 2 litres,
- 1 cylindre gradué de 100 ml,
- 1 bécher de 1 litre.

### Réactifs

(Quantités nécessaires pour 1 échantillon à extraire)

- n-hexane ( $C_6H_{14}$ , Malinckrodt) : 150-200  $cm^3$
- dichlorométhane ( $CH_2Cl_2$ , Merck) : 20-30  $cm^3$

### Procédure

L'échantillon d'eau de pluie n'est pas filtré mais soumis à une agitation vigoureuse avant l'extraction. Un litre d'eau est placé dans un ballon de deux litres avec 60 ml d'un mélange d'hexane et de dichlorométhane (85/15 v/v). Le tout est mélangé par agitation magnétique pendant 15 minutes. Le dichlorométhane renforce les propriétés de dissolution de l'hexane, solvant de base pour les PCB et les organo-chlorés [Rodriguez et al. 1980]. Le mélange est transféré dans une ampoule à décanter. On laisse séparer les deux phases durant 30 minutes. La phase organique est recueillie. L'extraction de la phase aqueuse est répétée deux fois.

### Critique de la méthode

Le dichlorométhane renforce les propriétés de dissolution de l'hexane, solvant de base pour les PCB et les organo-chlorés [Rodriguez et al., 1980]. Cette propriété confère à cette méthode d'extraction l'avantage d'être très performante. Le désavantage de la méthode réside dans le fait qu'on manipule des quantités relativement importantes de dichlorométhane, solvant toxique. Un travail permanent sous une hotte aspirante est indispensable.

---

Fiche analytique No 3 : Extraction des esters phtaliques des échantillons de boue d'épuration et de sols.
---

Référence principale : Russel & Mc Duffie (1983)

**Matériel**

- 1 lyophilisateur (Secfroid, Minilyo I, 3002)
- 1 extracteur Ultra-Turrax (Janke & Kunkel - IKA WERK)
- 1 bécher 400 ml
- 1 ballon rodé de 250 ml
- 1 tube à centrifuger en quartz
- 1 centrifugeuse (MSE, 0-10.000 tours/min.)

**Réactifs**

(Quantité nécessaire pour 1 échantillon à extraire)

- n-hexane ( $C_6H_{14}$ , Malinckrodt) : 30-60 cm<sup>3</sup>

**Procédure**

La fragilité des phtalates empêche une digestion préalable des échantillons, qu'elle soit basique ou acide. L'échantillon de boue ou de sol lyophilisé est pesé dans une éprouvette en quartz pour la centrifugation. On y introduit 10 à 20 cm<sup>3</sup> d'hexane, ensuite on introduit la tête de l'extracteur et on soumet le mélange à une agitation énergique durant 10 minutes. L'ensemble est centrifugé à 2000 tours/min. durant 10 minutes. La phase organique surnageante est recueillie dans un ballon propre. On reprend la procédure d'extraction à deux reprises.

**Critique de la méthode**

Des émulsions très tenaces se forment souvent avec les boues d'épuration. Dans ce cas les procédures de centrifugation prennent beaucoup de temps.

---

## 2) LES TECHNIQUES DE PURIFICATION DES EXTRAITS.

Fiche analytique No 4 : Purification des extraits hexane de tous les types d'échantillons de l'environnement contenant des PAH: la partition liquide-liquide

Référence principale : Dunn et al., 1980

### Matériel

- 3 ballons à décanter gradués de 100 ml
- 1 erlenmeyer de 400 ml
- 1 ballon poire de 250 ml

### Réactifs

(Quantités nécessaires pour 1 échantillon à purifier)

- n-pentane ( $C_5H_{12}$ , Merck) : 60-80 ml
- DMSO ( $CH_3-SO-CH_3$ , Fluka) : 20 ml
- eau bidistillée, lavée à l'hexane : 40 ml
- sulfate de sodium anhydre : 10 g

### Procédure

Cette technique de purification est destinée à séparer les PAH des autres composés organiques. Elle fait suite aux fiches analytiques 1 et 2. L'extrait hexane contenant les PAH est transféré dans 5 ml de DMSO. Le solvant restant est évaporé.

Les hydrocarbures alyphatiques sont éliminés en lavant le DMSO au moyen de 10 ml de n-pentane. Les traces de PAH dissous par le n-pentane sont extraites au moyen de 10 ml de DMSO frais.

Les alcools, les acides carboxyliques et les phénols sont éliminés de la façon suivante : on réunit les deux extraits de DMSO, on ajoute 20 ml de pentane pur et 40 ml d'eau. L'eau qui est en excès va chasser les PAH dans la phase pentane en prenant leur place sur les sites nucléophiles du DMSO, sous forme de liaisons hydrogènes. Les alcools, acides et phénols restent dans la phase DMSO car leur liaisons par pont hydrogène sont plus stables que celles de l'eau. Finalement on lave une dernière fois la phase eau-DMSO avec une portion de 20 ml de pentane pur et on réunit les phases pentanes dans un erlenmeyer contenant un peu de  $Na_2SO_4$  anhydre. Cette étape sert à sécher convenablement l'échantillon.

### Critique de la méthode

Cette méthode de purification comporte un grand inconvénient : les multiples manipulations, en particulier les transvasements, font que cette technique est très imprécise quantitativement. Elle est remplacée par la méthode de purification sur colonne "alumine-silice" (Fiche analytique No 5).

---

Fiche analytique No 5 : Séparation des hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH) et des polychlorobiphényles (PCB) par chromatographie sur colonne.

Référence principale : Albaigés et al., 1982.

**Matériel**

- 1 colonne en verre avec robinet en téflon, longueur : 30-40 cm, diamètre : 1 cm.
- 2 béchers de 50 cm<sup>3</sup>
- 2 petits entonnoirs en verre
- 1 baguette de verre de 50 cm
- 2 creusets en porcelaine de 150 cm<sup>3</sup>
- 1 dessicateur
- 1 pipette graduée de 5 ml
- 2 bouteilles en verre brun de 100 ml avec capsule à vis

**Réactifs**

(Quantités nécessaires pour 1 échantillon à purifier).

- Oxyde d'aluminium actif 90 (Merck),  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 0,063-0,2 mm : 8g
- Gel de silice 40 (Merck),  $\text{SiO}_2$ , 0,063-0,2 mm : 8g
- Eau bidistillée, lavée à l'hexane : 0,8 cm<sup>3</sup>
- N-hexane (Mallinckrodt),  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , 90 cm<sup>3</sup>
- Dichlorométhane (Merck),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 10 cm<sup>3</sup>
- Laine de verre

**Procédure**

Cette méthode de purification sert à séparer les PCB d'une part et les PAH d'autre part des autres substances organiques présentes dans les échantillons. Elle fait suite aux fiches analytiques 1 et 2.

a. Préparation des poudres : l'oxyde d'aluminium et le gel de silice sont activés respectivement à 110 °C et à 300 °C durant 12 heures dans les creusets en porcelaine. Après refroidissement des poudres à température ambiante dans un dessicateur, on transfère les quantités nécessaires d'oxyde d'aluminium et de gel de silice dans des bouteilles en verre brun. On ajuste ensuite leur taux d'humidité en ajoutant avec précision 5% (poids/poids) d'eau bidistillée. On ferme les bouteilles et on les agite vigoureusement durant 2 minutes. On laisse reposer les poudres durant 12 heures en dessicateur avant leur utilisation. A partir de ce moment les poudres humidifiées sont valables durant 24 heures.

b. Remplissage de la colonne (figure 70) : on introduit dans la colonne un manchon de laine de verre au moyen d'une baguette de verre. Le manchon ne doit pas être trop épais pour éviter le colmatage de la colonne. On remplit ensuite la colonne d'hexane jusqu'au 3/4 de sa hauteur. On pèse 8g de gel de silice dans un

petit b cher et on introduit la poudre dans la colonne au moyen d'un petit entonnoir. On procède ensuite de la même façon pour l'oxyde d'aluminium. Finalement on laisse s'écouler l'hexane jusqu'à 1/2 cm au dessus de la surface de la poudre.

**c. Elution :** l'échantillon à traiter est concentré jusqu'à 2-3 cm<sup>3</sup>. On l'introduit en tête de colonne au moyen d'une pipette pasteur. On en incorpore un maximum dans la poudre par une brève ouverture du robinet en teflon. On procède ensuite aux élutions suivantes :

- 20 ml d'hexane : entraîne les hydrocarbures saturés et les oléfines.
- 20 ml d'un mélange d'hexane et de dichlorométhane (90/10) : entraîne les hydrocarbures monoaromatiques et les PCB.
- 40 ml d'un mélange d'hexane et de dichlorométhane (80/20) : entraîne les hydrocarbures polycycliques aromatiques.

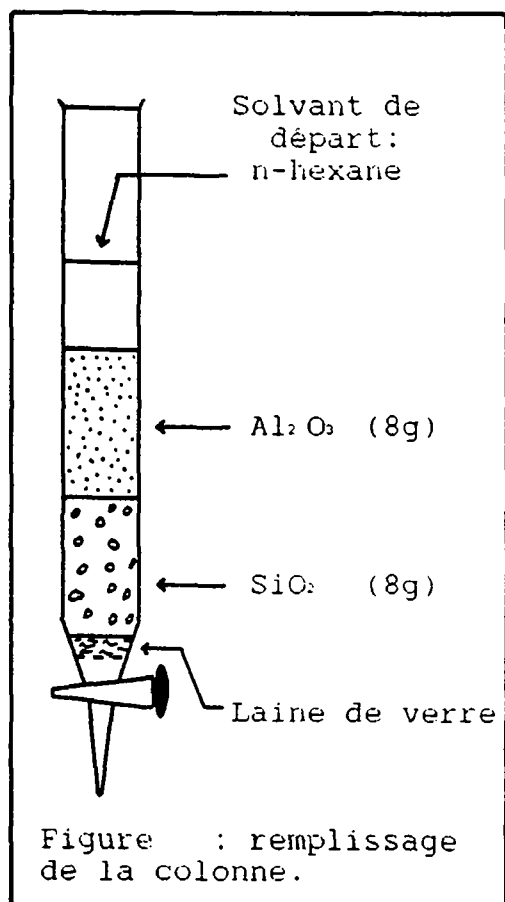


Figure 70: remplissage de la colonne en vue de la séparation des PAH et des PCB. (Fiche analytique No 5)

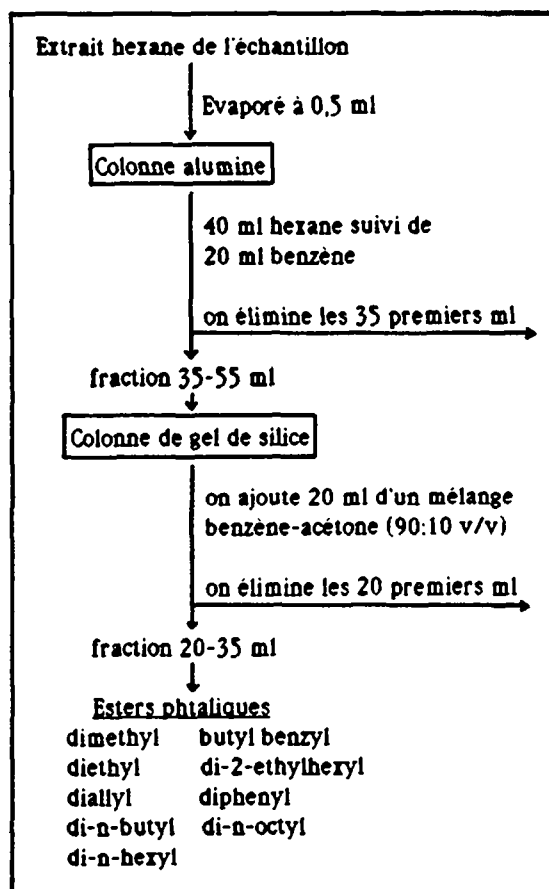


Figure 71: schéma d'élution pour séparer les esters phtaliques de tous types d'échantillons (Fiche analytique No 6)

### Critique de la méthode

Cette méthode permet de traiter simultanément PAH et PCB, ce qui représente un gain de temps important. La méthode est très précise, les taux de récupération d'échantillons dopés sont compris entre 92 et 96%.

Fiche analytique No 6 : Purification des extraits de phtalates de tous les types d'échantillons de l'environnement par double colonne "alumine-silice".

Référence principale : Russel & Mc Duffie, 1983

#### Matériel

- 2 colonnes en verre avec robinet en teflon, longueur 40 cm, diamètre 1 cm.
- 2 béchers de 50 cm<sup>3</sup>
- 2 petits entonnoirs en verre
- 1 baguette en verre de 50 cm
- 2 creusets en porcelaine de 150 cm<sup>3</sup>
- 1 dessicateur
- 1 pipette graduée de 5 ml.
- 2 bouteilles en verre brun de 100 ml avec capsule à vis.

#### Réactifs

(quantités nécessaires pour 1 échantillon à purifier)

- oxide d'aluminium actif 90 ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 0,063-0,2 mm, Merck): 8g
- gel de silice 40 ( $\text{SiO}_2$ , 0,063-0,2 mm, Merck): 8g
- sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , Merck) : 5g
- eau bidistillée : 1 cm<sup>3</sup>
- n-hexane ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , Mallinckrodt): 40 ml
- benzène ( $\text{C}_6\text{H}_6$ , Merck) : 20 ml

#### Procédure

Cette méthode de purification est destinée à séparer quantitativement les esters phtaliques d'un maximum de substances organiques interférentes. Elle fait suite à la fiche analytique No 3.

a. La préparation des poudres : elle se fait de la même façon que celle de la fiche analytique No 5, sauf que les deux poudres sont activées à 210 °C et qu'on les désactive au moyen d'eau bidistillée à raison de 9% (poids/poids) pour l'alumine et 0,3% (poids/poids) pour le gel de silice.

b. Le remplissage des colonnes : La manière de procéder est la même que celle de la fiche analytique No 5, sauf que dans ce cas on introduit les deux poudres dans deux colonnes différentes, qui chacune sont ensuite additionnées d'1g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre.

c. Elution: Elle s'effectue selon le schéma de la figure 71.

#### Critique de la méthode

Cette méthode de purification a le désavantage d'être très longue, mais le résultat est concluant. Peu de pertes d'échantillon et excellent taux de récupération ( $\pm 95\%$ ).

---

### 3). LES STANDARDS DE MICROPOLLUANTS ORGANIQUES.

#### Fiche analytique No 7 : Les standards de PAH

Les 15 PAH sélectionnés en vue de la constitution d'un standard ont été tous obtenus à l'état de cristaux. Le tableau 29 cite le nom des firmes auprès desquelles les PAH ont été achetés, ainsi que leur degré de pureté. Les cristaux de PAH ont été dissous dans du 2-propanol pour le naphthalène, l'acenaphthène, le fluorène et le phénanthrène et dans du chloroforme pour tous les autres PAH. Le chloroforme a été évaporé au moyen d'un léger courant d'azote. Après quelques dilutions en jaugé de précision, les PAH ont été finalement conservés dans du 2-propanol. Tomingas (1979) affirme que la stabilité des standards dépend fortement du solvant utilisé. Le méthanol serait un très mauvais solvant de conservation. Par contre des fractions de PAH dissoutes dans du 2-propanol et stockées pendant 1 an à 4 °C dans l'obscurité ne montrent pas de modifications de concentration. Nous pouvons confirmer cette constatation étant donné que notre standard a été conservé dans les mêmes conditions que celui de Tomingas (1979). Un nouveau standard a été constitué 16 mois après le premier. Les hauteurs des pics des 2 standards de dibenz(a,h)anthracène ont été comparées (Tableau 28).

Tableau 28: Comparaison de 2 standards de dibenz(a,h)anthracène constitués à 16 mois d'intervalle l'un de l'autre.

STANDARDS (mg/l)	HAUTEURS DES PICS (mm)		x	x corrigé	σ
	Injection 1	Injection 2			
A (0,86)	92,0	107,0	99,5	99,5	10,6
B (0,90)	98,5	104,7	101,2	96,7	3,9

Les hauteurs moyennes corrigées en fonction des concentrations de départ sont statistiquement égales ( $\alpha=0,05$ ).

Deux mélanges de standards ont finalement été préparés. Le standard 1 est 25 X plus concentré que le standard 2. Il est utile de travailler avec 2 standards de concentrations très différentes de façon à pouvoir réaliser pour chaque échantillon une adéquation en termes de concentration avec le standard le plus proche. La précision analytique s'en trouve améliorée.

On remarque que les concentrations des différents PAH varient fortement dans un même standard. Ces variations proviennent du fait que chaque PAH a une réponse très différente au détecteur de fluorescence.

Lors de la quantification des PAH dans les échantillons destinés aux tests respirométriques, nous avons utilisé une méthode par chromatographie en phase gazeuse (Fiche analytique No 11). Le standard utilisé (standard 3) était un mélange de 3,87 mg/l de phénanthrène, 3,98 mg/l de fluoranthène, 3,74 mg/l de pyrène et 7,37 mg/l de benzo(a)pyrène. Le mélange était constitué dans du 2-propanol.

Tableau 29: Les concentrations des 2 mélanges de standards de PAH

PAH	Firme (*)	Pureté (%)	Standard 1 (mg/l DMSO)	Standard 2 (µg/l DMSO)
Naphthalène	1	99	4,66	185
Acenaphthène	2	99	2,49	99
Fluorène	2	98	2,35	93
Phénanthrène	2	98	10,72	426
Anthracène	2	99	0,34	13
Fluoranthène	2	99	7,31	290
Pyrène	2	99	1,29	51
Benzo(a)Anthracène	2	99	0,68	27
Chrysène	2	98	8,60	342
Benzo(e)Pyrène	2	99	3,83	152
Benzo(b)Fluoranthène	3	99	2,55	101
Benzo(k)Fluoranthène	3	99	0,25	10
Benzo(a)Pyrène	2	98	0,28	11
Dibenz(a,h)Anthracène	2	98	0,86	34
Benzo(g,h,i)Perylène	2	98	0,96	38

(\*) 1 = Fluka, CH-9470 Buchs  
2 = Janssen Chimica, B-2340 Beerse  
3 = Analabs, U.S.A-06473 North Haven



Fiche analytique No 8 : Les standards de PCB

Deux mélanges de standards ont été utilisés pour quantifier les PCB dans les échantillons de l'environnement. Deux mélanges de PCB commerciaux et un mélange de 35 congénères purs de PCB.

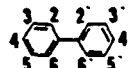
- les mélanges commerciaux:

.mélange JT2 : 0,059 µg/ml d'Aroclor 1242  
 0,068 µg/ml d'Aroclor 1254 dans l'hexane  
 0,060 µg/ml d'Aroclor 1260  
 .mélange JT3 : 0,180 µg/ml d'Aroclor 1242  
 0,200 µg/ml d'Aroclor 1254 dans h'hexane  
 0,180 µg/ml d'Aroclor 1260

- le mélange de congénères purs (Tableau 30) :

Les congénères assortis d'une étoile (\*) ont été obtenus sous forme de cristaux purs auprès de la firme Promochem (D-4230 Wesel). Les autres nous ont été fournis en solution par le laboratoire de Wallenberg (S-10405 Stockholm).

Tableau 30: le mélange des 35 congénères purs de PCB

NUMERO IUPAC (Ballschmider 1980)	CONCENTRATION EN SOLUTION (ng/g iso-octane)	SITES DE SUBSTITUTION 
8 *	12,34	2-4'
28 *	15,64	2,4-4'
44 *	12,54	2,3-2',5'
52 *	12,53	2,5-2',5'
64 *	12,56	2,3,6-4'
70	12,59	2,5-3',4'
84	12,79	2,3,6-2',3'
87	11,92	2,3,4-2',5'
92	25,12	2,3,5-2',5'
95 *	24,62	2,3,6-2',5'
99	25,82	2,4,5-2',4'
101 *	25,18	2,4,5-2',5'
105	12,24	2,3,4-3',4'
110 *	25,43	2,3,6-3',4'
118	25,18	2,4,5-3',4'
128	12,84	2,3,4-2',3',4'
135	25,12	2,3,5-2',3',6'
138 *	25,62	2,3,4-2',4',5'
141 *	24,69	2,3,4,5-2',5'
149 *	12,68	2,4,5-2',3',6'
151 *	24,69	2,3,5,6-2',5'
153 *	24,99	2,4,5-2',4',5'
156	24,43	2,3,4,5-3',4'
167	13,03	2,4,5-3',4',5'
170 *	24,56	2,3,4,5-2',3',4'
171	13,04	2,3,4,6-2',3',4'
172	25,32	2,3,4,5-2',3',5'
177	25,07	2,3,5,6-2',3',4'
180 *	12,81	2,3,4,5-2',4',5'
183	25,82	2,3,4,6-2',4',5'
187 *	24,93	2,3,5,6-2',4',5'
194 *	24,69	2,3,4,5-2',3',4',5'
196	25,07	2,3,4,5-2',3',4',6'
201	25,32	2,3,4,5-2',3',5',6'
209	26,07	2,3,4,5,6-2',3',4',5',6'

\* : congénères purs achetés chez Promochem  
 + : congénères purs illustrés sur la figure 4.

Fiche analytique No 9 : Le standard d'esters phtaliques.

Les 6 phtalates sélectionnés en vue de la constituer un standard ont été obtenus auprès de la firme Supelco (CH-1196 Gland). Les concentrations désirées, obtenues par dilutions successives dans du DMSO, sont mentionnées dans le tableau 31.

Tableau 31: le standard d'esters phtaliques

Phtalates	Abrev.	Pureté	Concentration (µg/ml DMSO)
Diméthyl-phtalate	DMP	99%	24,16
Diéthyl-phtalate	DEP	97%	29,25
Dibutyl-phtalate	DBP	97%	30,86
Butyl-benzyl-phtalate	BBP	95%	60,07
Diéthyl-hexyl-phtalate	DEHP	98%	84,82
Dioctyl-phtalate	DOP	98%	61,01

4). LES SYSTEMES D'ANALYSE ET DE DETECTION DES MICROPOLLUANTS.

Fiche analytique No 10 : La chromatographie liquide à haute pression pour l'analyse des PAH.

Référence principale : Ogan et al., 1979

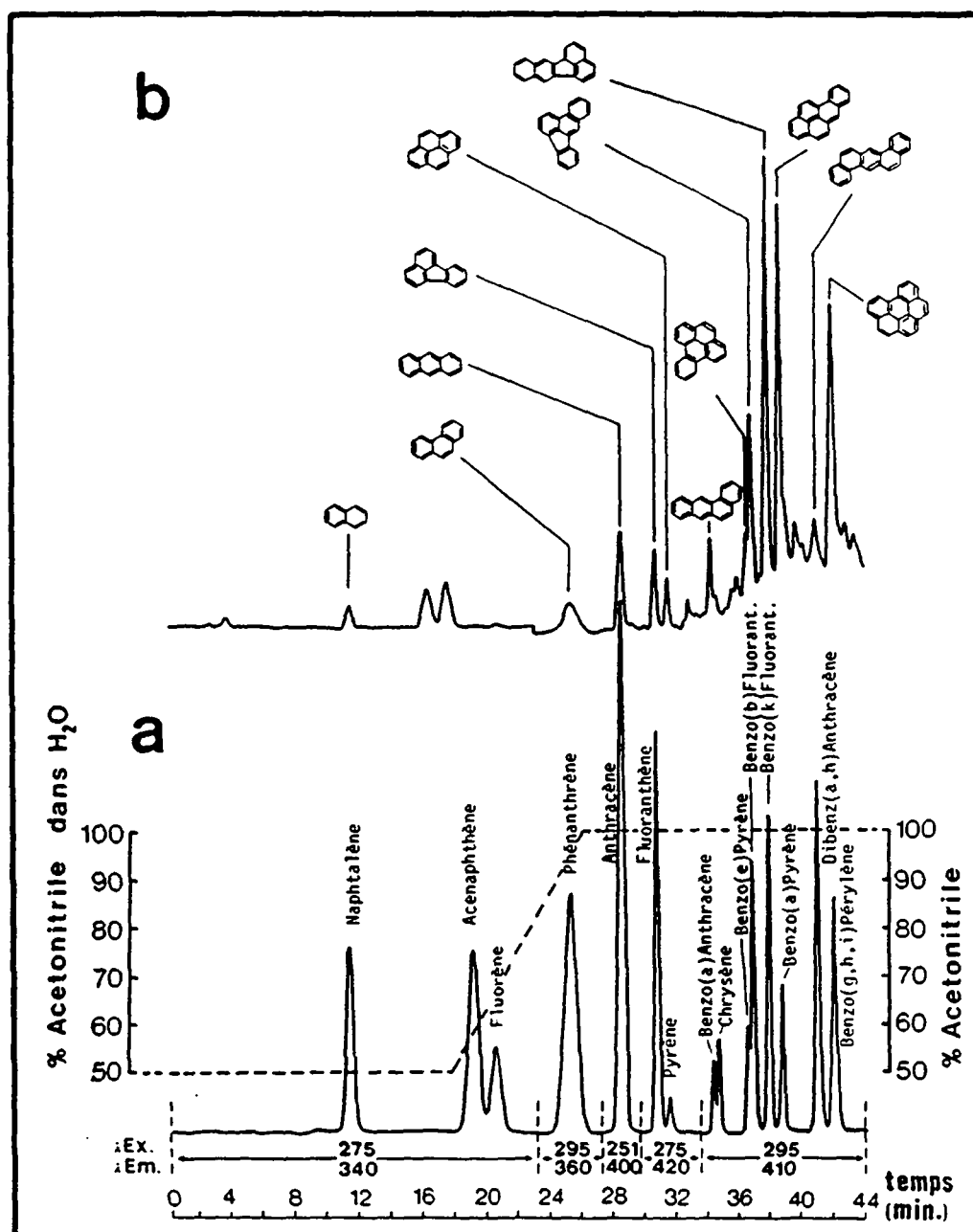


Figure 72: Chromatogrammes en phase liquide représentant un mélange standard de 15 PAH (a) ainsi que la fraction aromatique d'un extrait d'échantillon de sol. (Perkin-Elmer série 4, colonne HC ODS-C18, dét. de fluorescence)

Un chromatographe en phase liquide -Perkin-Elmer serie 4-, couplé à un détecteur de fluorescence -Perkin-Elmer LS 5- a été utilisé afin de quantifier les PAH dans les échantillons. La séparation des PAH a été effectuée au moyen d'une colonne "phase inversée" HC ODS/Sil-X de Perkin-Elmer. Le diamètre interne de la colonne est de 0,26cm et le diamètre des particules est de 10 $\mu$ . La colonne est équipée d'une précolonne Supelco LC-18 servant à retenir les impuretés qui subsistent éventuellement après la phase de purification des échantillons.

La figure 72 montre un exemple de chromatogramme obtenu, d'une part pour le standard 1 (a) et d'autre part pour un extrait de sol (b). Ces chromatogrammes sont assortis d'une échelle de temps, d'une courbe de programmation du mélange de solvants "eau-acétonitrile" pour la séparation des PAH et des couples de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sélectionnés pour la détection des PAH. Il est à noter qu'après chaque chromatogramme obtenu, un lavage de la colonne avec de l'acétonitrile pur est effectué durant 30 minutes afin d'éliminer toute trace de PAH pouvant subsister dans la colonne.

#### Le calcul de la concentration des PAH:

Ce calcul s'est fait selon la formule suivante :

$$\text{Concentration} = \frac{H_1 \times \text{Vol.1} \times \text{Std.}}{H_2 \times \text{Vol.2}}$$

H<sub>1</sub> = Hauteur du pic de PAH de concentration inconnue (mm)

H<sub>2</sub> = Hauteur du pic de PAH du standard (mm)

Vol. 1 = volume de l'extrait final purifié (ml)

Vol. 2 = volume de l'échantillon liquide à analyser (ml)  
ou poids sec de l'échantillon solide (g)

Std. = concentration du standard ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  ou  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )

Tous les volumes d'injection dans l'HPLC sont fixés à 6 $\mu$ l par la boucle d'injection.

Le poids sec des échantillons à analyser est obtenu par un séjour de 24 heures minimum dans un lyophilisateur Secfroid (Minilyo I, 3002) dans lequel une pression égale ou inférieure à 0,1 mbar doit être obtenue.

#### La reproductibilité des réponses et des temps de rétention par le détecteur de fluorescence.

Le standard 1 a été injecté à 5 reprises dans la colonne analytique selon les conditions spécifiées en début de paragraphe. La première injection est prise comme référence à laquelle les 4 autres sont comparées. Les résultats des reproductibilités des réponses du détecteur et des temps de rétention sont indiquées respectivement sur les tableaux 32 et 33. En ce qui concerne les déviations standards relatives ( $\sigma_1$ ) des réponses du détecteur, elles varient entre 9.10<sup>-3</sup>% et 7,5% et entre 0,1% et 1,8% pour les temps de rétention. Comparons ces résultats avec ceux obtenus par Bulman et al. (1985).

Tableau 32: Reproductibilité des réponses du détecteur de fluorescence pour les 15 PAH du standards 1.

PAH	CONCENTRATIONS (mg/l)					MOYENNE x	VARIANCE $\sigma$	VARIANCE RELATIVE %
	1 Cal.	2	3	4	5			
Nph	4,66	4,66	4,53	4,66	4,66	4,63	$6 \cdot 10^{-2}$	1,2
Ace	2,49	2,46	2,37	2,67	2,52	2,50	$1 \cdot 10^{-1}$	4,7
F	2,35	2,35	2,27	2,58	2,43	2,40	$1 \cdot 10^{-1}$	5,0
Phe	10,72	10,72	10,41	11,33	10,57	10,75	$3 \cdot 10^{-1}$	3,3
An	0,34	0,34	0,33	0,33	0,35	0,34	$1 \cdot 10^{-2}$	2,5
Ft	7,31	7,31	6,81	6,81	7,06	7,06	$2 \cdot 10^{-1}$	$3 \cdot 10^{-2}$
Pyr	1,29	1,24	1,29	1,09	1,34	1,25	$1 \cdot 10^{-1}$	7,5
B(a)A	0,68	0,67	0,66	0,67	0,66	0,67	$1 \cdot 10^{-2}$	1,2
Chy	8,60	8,33	8,06	8,33	8,60	8,38	$2 \cdot 10^{-1}$	$3 \cdot 10^{-2}$
B(e)P	3,83	3,66	3,61	3,66	3,77	3,71	$9 \cdot 10^{-1}$	$2 \cdot 10^{-1}$
B(b)F	2,55	2,37	2,55	2,55	2,73	2,55	$1 \cdot 10^{-1}$	$5 \cdot 10^{-2}$
B(k)F	0,25	0,24	0,24	0,25	0,25	0,25	$5 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-2}$
B(a)P	0,28	0,28	0,27	0,28	0,28	0,28	$4 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-2}$
DBA	0,86	0,84	0,83	0,81	0,84	0,84	$2 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-2}$
BP	0,96	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	$9 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-3}$

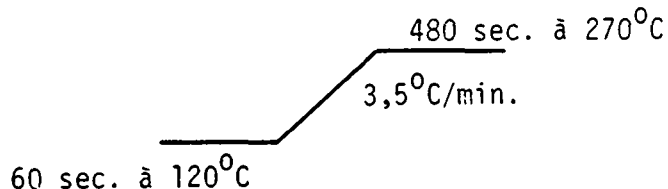
Par rapport aux chiffres donnés dans cette recherche, les déviations standard relatives en ce qui concerne les réponses du détecteur, sont équivalentes, mais elles sont moins bonnes pour les temps de rétention par rapport aux chiffres donnés dans cette recherche. La meilleure reproductibilité des temps de rétention obtenue par Bulman et al. (1985), provient du fait que ces chercheurs laissent couler nuit et jour du solvant à travers la colonne analytique. Cette mesure n'a jamais été adoptée dans notre laboratoire par souci d'économie. De plus nous avons remarqué durant toute la durée de cette recherche que la fiabilité des temps de rétention n'était pas le point fort de la pompe HPLC Sigma 4 de Perkin-Elmer. Cette constatation est principalement vérifiée pour les temps de rétention intervenant lors des modifications des proportions des solvants.

Tableau 33: Reproductibilité des temps de rétention des 15 PAH.

PAH	TEMPS DE RETENTIONS (min.)					MOYENNE x	VARIANCE $\sigma$	VARIANCE RELATIVE %
	1 Cal.	2	3	4	5			
Nph	8,7	8,9	8,6	8,8	8,8	8,78	0,11	1,3
Ace	13,5	14,0	13,7	13,9	13,8	13,78	0,19	1,4
F	15,5	15,7	15,2	15,5	15,0	15,38	0,28	1,8
Phe	18,9	19,6	19,0	19,3	19,0	19,16	0,29	1,5
An	25,2	25,3	25,7	25,1	25,0	25,26	0,27	1,1
Ft	32,0	31,5	31,9	31,8	32,0	31,84	0,21	0,6
Pyr	35,7	35,6	35,4	35,6	35,5	35,56	0,11	0,3
B(a)A	41,5	41,4	41,3	41,4	41,4	41,40	0,07	0,2
Chy	42,5	42,4	42,4	42,3	42,4	42,40	0,07	0,2
B(e)P	44,6	44,6	44,5	44,6	44,6	55,58	0,04	0,1
B(b)F	45,8	45,8	45,7	45,8	45,8	45,78	0,04	0,1
B(k)F	47,5	47,6	47,5	47,6	47,6	47,56	0,05	0,1
B(a)P	48,9	49,0	49,0	49,1	49,0	49,00	0,07	0,1
DBA	54,3	54,2	54,3	54,3	54,3	54,28	0,04	0,1
BP	55,2	55,4	55,3	55,2	55,3	55,28	0,08	0,2

Fiche analytique No 11 : La chromatographie en phase gazeuse  
pour la détection des PAH.

Les échantillons purifiés sont injectés dans un chromatographe Dany équipé d'une unité de vaporisation thermiquement contrôlée (PTV). Ce système permet d'injecter à froid l'échantillon sur une précolonne. En 15 secondes l'échantillon est porté à 300°C. Cette technique permet d'une part une meilleure élimination du solvant et d'autre part empêche que des résidus non volatils n'entrent dans la colonne capillaire. La colonne capillaire utilisée est en silice fondue revêtue d'une phase mobile réticulée Supelco SPB-5 (SE-54), de diamètre interne de 0,25  $\mu\text{m}$  et de longueur de 50m. La température de l'injecteur PTV est programmée afin qu'elle reste pendant 1 seconde à 50°C, qu'elle monte ensuite en 5 secondes à 300°C pour rester à cette température durant 55 secondes. Le programme des conditions de température du four est le suivant :



Le détecteur est à une température de 290°C. Le gaz vecteur est de l'azote 50 passant à travers un purificateur de gaz à charbon actif Supelco. La flamme du détecteur est formée par la combustion d'un mélange d'hydrogène et d'air dans les proportions 2/1.

La quantification des PAH se fait par comparaison des hauteurs des pics de l'échantillon par rapport à celles du standard 3 (Fiche analytique No 7) injecté le même jour.

---

Fiche analytique No 12 : La chromatographie en phase gazeuse pour la détection des PCB.

Les échantillons purifiés sont injectés en mode "split" (1/12) dans un chromatographe Perkin-Elmer Sigma 2 muni d'une colonne capillaire en silice fondue revêtue d'une phase mobile réticulée Supelco SPB- 5 (diamètre interne = 0,25  $\mu$ m, longueur = 30 m). La température de l'injecteur est de 275°C et celle du détecteur de 350°C. Le programme des conditions établit une variation de la température du four en deux paliers :

1 sec. à 130°C / 3,5°C/min. / 2 min. à 265°C / 5°C/min. / 5 min à 285°C

Le second palier à 285°C est un processus de nettoyage rapide de la colonne.

La quantification des PCB a été faite par comparaison des surfaces de 33 pics d'un des deux standards JT2 ou JT3 (Fiche analytique No 8) avec celles des pics correspondants dans le chromatogramme de l'échantillon. Cette méthode nécessite un programme de calcul installé sur un ordinateur personnel Hewlett-Packard 9845 B. L'intégration des pics a été effectuée au moyen d'un appareil de traitement des données Perkin-Elmer Sigma 10. Dans le cas des congénères purs de PCB une simple comparaison entre la surface du congénère à quantifier dans l'échantillon et celle du standard a été effectuée. Un exemple de chromatogramme est illustré à la figure 73.

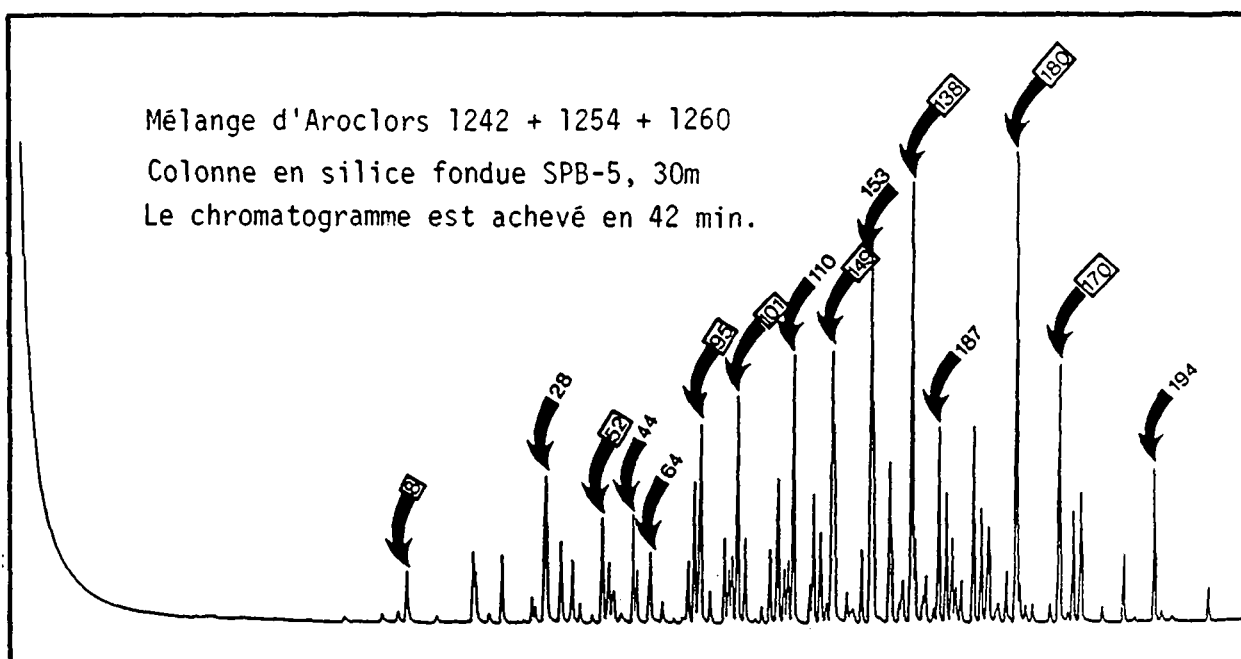


Figure 73: Chromatogramme d'un standard de PCB du commerce. Indication de la position de 15 congénères de PCB importants. (numéros encadrés = congénères sélectionnés dans l'étude des voies de pénétration des PCB dans les sols agricoles, chapitre 3)

Fiche analytique No 13 : La quantification des esters phtaliques par chromatographie liquide à haute pression.

Le même type d'appareillage et de colonne chromatographique a été utilisé pour l'analyse des esters phtaliques que dans le cas de l'analyse d'hydrocarbures polycycliques aromatiques décrite à la fiche analytique No 10. Une seule exception cependant : la détection des phtalates a été effectuée au moyen d'un détecteur ultra-violet Coleman 55 dont la longueur d'onde de détection était fixée à 233 nm. La durée chromatographique ainsi que la programmation des solvants est illustrée par un exemple à la figure 74.

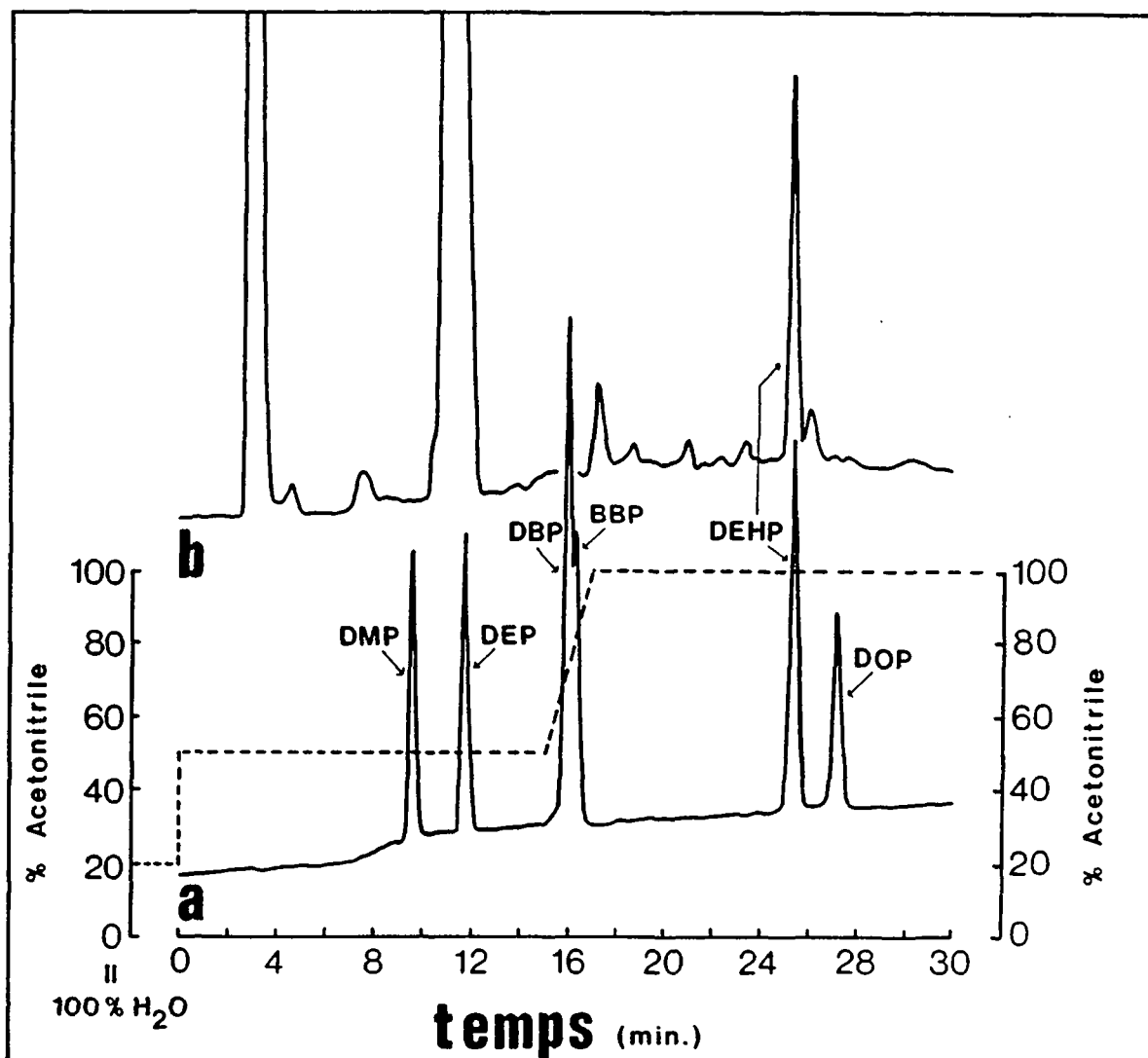


Figure 74: Chromatogramme en phase liquide d'un mélange de 6 standards de phtalates (a) et de la fraction phtalate d'un échantillon de boue d'épuration (b).



C U R R I C U L U M   V I T A E

DIERCXSENS Philippe, né le 29 avril 1957 à Anvers (Belgique), marié, 1 enfant, nationalité belge.

---

Formation

- 1970 - 1975      Ecole secondaire de type classique (latin-grec) à l'école abbatiale de Saint André, Bruges (Belgique).
- 1975 - 1980      Candidatures et licences en sciences chimiques aux Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur (Belgique).
- 1980              Agrégation de l'enseignement secondaire supérieur.
- 1981              Cours postgrade en Génie de l'Environnement, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL).
- 1982 - 1983      Chercheur au laboratoire d'écotoxicologie (Prof. Joseph TARRADELLAS) de l'EPFL.
- 1983              Service militaire à l'Hopital militaire belge de Cologne.
- depuis 1984      Chercheur au laboratoire d'écotoxicologie de l'EPFL, préparation de la présente thèse de doctorat.

Activités associées

Enseignement à l'EPFL : Analyse des micropolluants organiques, travaux pratiques dans le cadre du 3e Cycle en protection de l'environnement (1984 et 1986).

Publications

- TARRADELLAS J., DIERCXSENS P., BOUCHE M.B. (1982) :  
*Methods of extraction and analysis of PCBs from earthworms*, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 13, 55.
- TARRADELLAS J., DIERCXSENS P. (1983) :  
*Les micropolluants organiques dans les boues d'épuration*, Schweiz. Arch. Tierheilk., 125, 589.
- DIERCXSENS P., TARRADELLAS J. (1983) :  
*Presentation of the analytical and sampling methods and of results on organochlorines in soils improved with sewage sludges and composts*, In : "Environmental effects of organic and inorganic contaminants in sewage sludge", D. Reidel publ. comp., Dordrecht, The Netherlands, 59.

DIERCXSENS P., DE WECK D., BORSINGER N., ROSSET B. , TARRADELLAS J.  
(1985) :  
*Earthworm contamination by PCBs and heavy metals*,  
*Chemosphere*, 14, 5, 511.

DIERCXSENS P., TARRADELLAS J. (1987) :  
*Soil contamination by some organic micropollutants related  
to sewage sludge spreading*, *Intern. J. Environ. Anal.  
Chem.*, 28, 143.

DIERCXSENS P., WEGMANN M., DANIEL R., HAENI H., TARRADELLAS J.  
(1987) :  
*Apport par les boues d'épuration de micropolluants  
organiques dans les sols et les cultures*, *Gaz, Eaux, Eaux  
usées*, 3, 123.

---